

**PhD ÉRTEKEZÉS**

**KIRÁLIS MAKRODOMÉNEK STRUKTÚRAVÁLTOZÁSAI KLOROPLASZTISZ  
TILAKOID MEMBRÁNJAIBAN**

ISTOKOVICS ANITA

Témavezető:

Dr. Garab Győző  
tudományos tanácsadó

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Növénybiológiai Intézet  
Szeged  
1997

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>5</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>7</b>
2.1. Fényreakciók a tilakoid membránban	7
2.2. A tilakoid membrán ultrastruktúrája	9
2.3. A második fotokémiai rendszer	10
2.4. A PSII antennarendszere	10
2.5. Az LHCII, a PSII perifériális antennája	11
2.6. CD spektroszkópia	14
2.7. A klorofill molekulák CD spektruma különböző rendszerekben	15
2.8. Fényindukált CD változások	18
2.9. A fénygátlás elleni védekezés	20
2.9.1. Bizonyítékok az LHCII-t magába foglaló kioltó mechanizmus létére	22
2.9.2. A $\Delta pH$ szerepe	23
2.9.3. A zeaxantin szerepe	24
<b>3. CÉLKITŰZÉS</b>	<b>26</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>29</b>
4.1. Növényi anyag	29
4.1.1. Intakt kloroplastisz	29
4.1.2. Tilakoid membrán	30
4.2. Műszeres mérőmódszerek	30
4.2.1. A klorofill tartalom meghatározása	30
4.2.2. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	31
4.2.3. Fényindukált fényszórás mérés	32
4.2.4. A fényindukált fluoreszcencia kioltás mérése	32
4.2.5. Az elektrontranszport sebességének mérése	33
4.2.6. A $\Delta pH$ mérése	33
4.2.7. A $Mg^{2+}$ ion felszabadulásának mérése	33
4.2.8. A citokróm $b_{559}$ redox állapotainak és tranzienseinek mérése	34

4.2.9. <i>Az elektrokróm abszorpcióváltozás mérése</i>	35
<b>5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK</b>	<b>36</b>
5.1. A makrodomén szerveződés szerepe	36
5.2. A makrodomének struktúraváltozásának hőmérséklet függése	40
5.3. Az elektrontranszport és a fényindukált CD változás kapcsolata	42
5.4. A transzmembrán $\Delta\text{pH}$ és a fényindukált CD változás kapcsolata	45
5.5. A DCCD hatása	47
5.6. A makrodomének struktúraváltozásának gátlása kinon antagonistá vegyületekkel	48
5.6.1. <i>Az antimycin A és a myxothiazol hatása</i>	48
5.6.1.1. A fényindukált CD változás	49
5.6.1.2. Fényindukált fényelnyelés változás	52
5.6.1.3. A lineáris elektrontranszport	54
5.6.1.4. Klororespiráció	55
5.6.1.5. Detergens hatás	56
5.6.2. <i>Más kinon antagonistá vegyületek hatása</i>	57
5.7. A kationok hatása	59
5.8. $\text{Mg}^{2+}$ ion felszabadulása	65
5.9. Az A23187 ionofór hatása	68
5.10. Az antenna struktúraváltozása és a kloroplasztiszból lejátszódó más folyamatok kapcsolata	70
5.10.1. <i>A citokróm <math>b_{559}</math></i>	70
5.10.2. <i>Az LHCII foszforilációja</i>	72
5.10.3. <i>A membrán permeabilitása</i>	73
<b>6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA</b>	<b>75</b>
6.1. A struktúraváltozás általános jellemzése	76
6.2. A fotoszintetikus reakcióút és a fényindukált struktúraváltozás összefüggése	80
6.3. A makrodomén struktúraváltozás fénygátlással szembeni szerepe - összehasonlítása a $q_E$ -vel	82
6.4. Kationok hatása	87
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>91</b>
<b>FELHASZNÁLT IRODALOM</b>	<b>93</b>

## Rövidítések jegyzéke

CD:	cirkuláris dikroizmus
DAD:	diaminodurén
DBMIB:	2,5-dibromo-3-metil-6-izopropil-p-benzokinon
DCCD:	N,N-diciklohexilkarbodiimid
DCMU:	3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetilurea
HP és LP:	magas és alacsony redox potenciálú forma
HQNO:	2-heptil-4-hidroxikinolin
kl-a és kl-b:	klorofill a és klorofill b
LHCII:	a második fotokémiai rendszer fénybegyűjtő klorofill-protein komplexe
PMS:	N-metil-fenazin-metoszulfát
psi:	polimerizáció vagy só hatására indukált
PSI és PSII:	első és második fotokémiai rendszer
qE:	energiafüggő nem-fotokémiai kioltás

## 1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis az a folyamat, amelynek során a magasabbrendű növények, algák, cianobaktériumok és fotoszintetikus baktériumok a napfény energiáját kémiai energiává alakítják. Végeredményben a fotoszintézis látja el a bioszféra egészét táplálékkal. A fotoszintézisnek köszönhető a Föld oxigéndús atmoszférája és az elhasznált oxigén folyamatos újratermelése. A fotoszintézis szerepet játszott a fosszilis energiahordozók kialakulásában is.

A fotoszintézis folyamata a fény elnyelésével kezdődik. Az antenna pigmentek által elnyelt fényenergia a reakciócentrumokba jut, ahol a primer töltésszétválasztás történik. Azt ezt követő redox folyamatok és a töltések irányított szállítása az elektrontranszportláncban eredményezi a felszabaduló molekuláris oxigént és a redukáló erőt hordozó NADPH-t. A töltésszétválasztás és az elektrontranszportot kísérő protonpumpa működése során a tilakoid membrán két oldala között létrejön egy elektromos potenciál és pH különbség, amelyek az ATP szintézise során hasznosulnak. Az ATP molekulában tárolt kémiai energiát és a NADPH redukáló erejét felhasználva játszódnak le a szerves anyagok szintézisének lépései.

A fotoszintézis kutatások ezen biológiai folyamatok megismerésére irányulnak, szem előtt tartva a gyakorlati alkalmazás lehetőségét is, pl. a növénynevelés és növényvédelem, a környezetvédelem és az alternatív energiaforrások területén.

Az elnyelt fényenergia reakciócentrumokba továbbításának hatékonysága ill. az energiavesztés minimalizálása erősen függ az antennarendszer struktúrájától. Molekuláris szerveződésének jelentőségére mutat az a tény, hogy az antennarendszer szerkezete rövid és hosszabb távon érvényesülő szabályozó folyamatok révén

módosulhat (Anderson és Andersson, 1988). Ez a reguláció részleteiben nem ismert. Nem tisztázott az antenna szerepe sem és nagyon keveset tudunk az antennarendszer szerkezeti dinamikájáról.

Dolgozatomban a gránumos kloroplasztiszok antennarendszerének fényindukált reverzibilis struktúraváltozásait vizsgáltam azzal a céllal, hogy részletes jellemzésük révén közelebb kerüljünk a szerkezeti dinamika feltételezett szabályozó szerepének megismeréséhez.

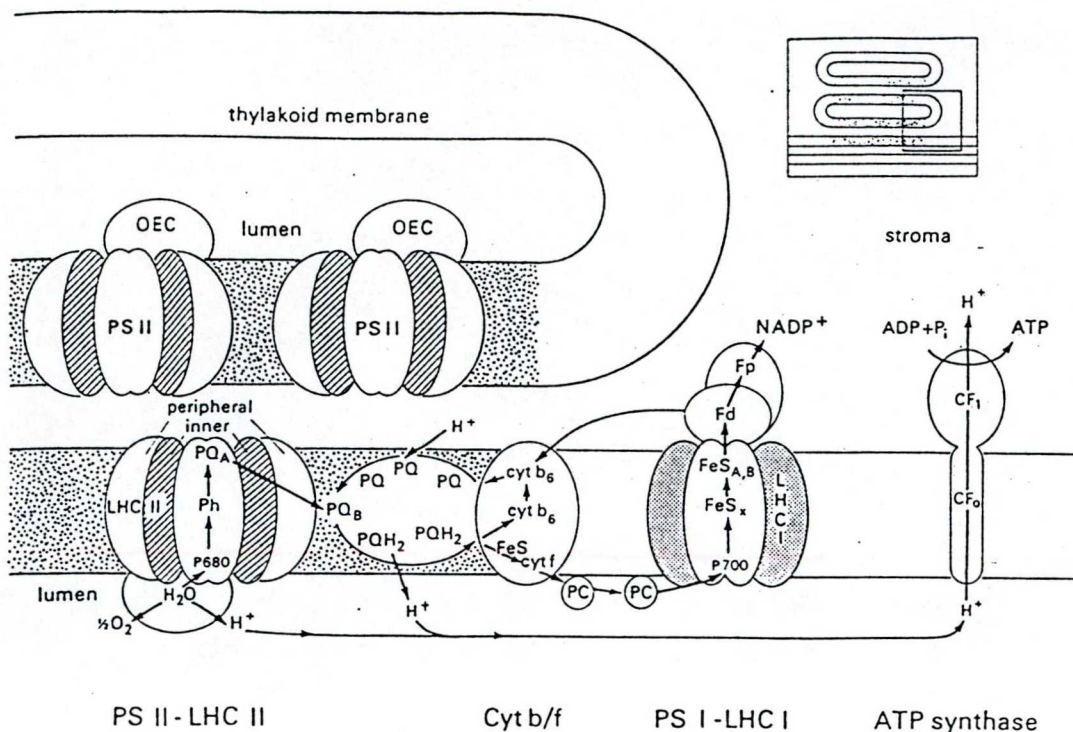
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Fényreakciók a tilakoid membránban

Zöld algák és magasabbrendű növények fotoszintetikus apparátusa a prokarióta szervezetekhez képest nagyfokú komplexitást mutat. A legtöbb sejt kifejlett kloroplasztiszaiban ún. sztróma lamellák kötik össze a tapadt membránokat tartalmazó gránumokat úgy, hogy a kloroplasztisz teljes membránrendszere összefüggő belső vizes fázissal rendelkezik.

Az ATP és a NADPH előállítása a tilakoid membránban négy, egymástól elkülönült multi-peptid komplexen keresztül játszódik le. Ezek a PSII, a citokróm  $b_6/f$  komplex, a PSI és az ATP-szintetáz. Ez utóbbi az ATP szintézis helye, míg a másik három a víztől  $\text{NADP}^+$ -ig tartó elektrontranszportoz szükséges. E komplexeket egymással a laterálisan mozgó plasztokinon és a plasztocianin kapcsolja össze (Marder és Barber, 1989).

A tilakoid membránok szerkezeti differenciálódása sztróma és gránum tilakoidokra a komplexek laterális heterogenitásával társul. Az ATP szintetáz és a PSI kizárólag a sztróma régióban, míg a PSII legnagyobb része az összetapadt régióban lokalizálódik. A citokróm  $b_6/f$  komplex mindkét régióban megtalálható (1. ábra).



1. ábra A komplexek elhelyezkedése a tilakoid membránban, laterális heterogenitásuk és az elektrontranszport vázlatja. (Anderson és Andersson, 1988).

A növények többféle környezeti változásnak vannak kitéve: pl. a fény és hőmérséklet napi és évszakos vagy esetenként igen gyors változása, a vízmennyiség és más hatások, ami elől a növény (az állatokkal ellentétben) nem tud kitérni. Egyre több adat mutatja, hogy a tilakoid membránban az összetétel és a szerveződés dinamikus változása nélkülözhetetlen az állandóan változó környezettel szembeni védekezésben és a fotoszintetikus rendszer optimalizálásában. Az adaptációnak molekuláris szinten különös jelentősége van. A növény mind rövid, mind hosszútávú stratégiákkal rendelkezik. A hosszútávú adaptáció a fotoszintetikus membrán összetételének változását kívánja meg, míg a rövidtávú adaptációhoz általában a meglévő membránkomponensek újraszerveződése szükséges (lásd. még 2.5. fejezet).



## 2.2. A tilakoid membrán ultrastruktúrája

Számos a tilakoid membránban lejátszódó fotoszintetikus folyamat erősen függ a tilakoid membrán szerkezetétől. Például, az elnyelt fényenergia reakciócentrumok közötti megoszlása is nagyban függ a membránok összekapcsolódásától, a gránumos forma kialakulásától. A membránok kationokon keresztüli összetapadását (amelyet dolgozatomban stacking-nek nevezek) a közeg ionerőssége határozza meg. Igen kis koncentrációjú egyértékű kationok jelenlétében (1-5 mM), a töltéssel rendelkező membránok taszítása miatt a membránok közötti kapcsolat fellazul. A tilakoid membránt kb. 50-50 %-ban proteinek és lipidek építik fel, amelyek közül több töltéssel rendelkezik (negatívan töltött foszfolipidek, fehérjék negatívan töltött karboxilcsoportjai) (Duniec és mtsi, 1979). Így a lipidek és fehérjék együtt alakítják ki a a membrán felületi töltését, amelynek felületi eloszlása nem egyenletes (Barber és Chow, 1979).

Korábban többen vizsgálták a különböző kationok szerepét a membrán stacking kialakulásában (Gross és Prasher 1974; Barber és mtsi 1977). Megállapították, hogy azonos vegyértékű kationok kb. ugyanakkora stackinget alakítanak ki (ez alól kivételt képeznek a membránnal specifikus kölcsönhatást kialakító ionok). Ahogy nő a pozitív töltések száma egyre kisebb ionkoncentráció szükséges a hasonló nagyságú stacking kialakításához. Ez sokkal inkább általános elektrosztatikus tulajdonságokkal magyarázható, mint az ionok specifikus tulajdonságával. A hatás leírására a Gouy-Chapman modellt használják (Barber, 1980).

Bár a membrán stacking kisebb mértékben kialakul kl-b hiányos mutánsokban is, de a gránumos szerkezet kialakulását nagy mértékben elősegíti az LHCI jelenléte (Barber és Chow, 1979).

### ***2.3. A második fotokémiai rendszer***

Az alapvető fényreakciók a fotoszintetikus membrán pigment-protein komplexeiben mennek végbe: a töltésszétválasztás a reakciócentrumokban játszódik le, míg az ehhez szükséges gerjesztési energia legnagyobb részét az antennakomplexek gyűjtik össze. A fotoszintetikus reakciócentrum fényenergia általi közvetlen gerjesztése igen ritka. Átlagos megvilágítási viszonyok mellett ugyanis a reakciócentrumok kl-a molekulái hozzávetőlegesen másodpercenként csak egyszer gerjesztődnének, ezért az optimális működéshez alapvetően szükség van antenna pigmentekre (Junge, 1977b).

A második fotokémiai rendszert mintegy 25 polipeptid építi fel. A PSII reakciócentruma a D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> protein heterodimer komplexe, amelyhez a citokróm b<sub>559</sub> is kapcsolódik (Nanba és Satoh, 1987). Ezen kívül a PSII tartalmazza a vízbontó rendszer polipeptidjeit és az antenna pigment-protein komplexeket is.

### ***2.4. A PSII antennarendszere***

A PSII belső antennáját két, kl-b molekulát nem tartalmazó komplex építi fel, a CP47 és CP43, amelyek polipeptidenként 20-25 kl-a és 5 β-karotin molekulát képesek megkötni. A PSII belső antennájához közel helyezkedik el néhány kisebb kl-a és kl-b

tartalmú komplex, amelyek kl-a/kl-b aránya 2 és 5 között változik. Ezeket minor LHC komplexeknek is nevezik (Dainese és Bassi, 1991; Green és mtsi 1991). Ezek molekulatömeg alapján CP29, CP26 és CP24 néven ismertek (Peter és Thornber, 1991), vagy mint LHCIa, LHCIc és LHCIId. Ez utóbbi nomenklatúra szerint az LHCII LHCIb-nek nevezik (Jansson, 1994). (Dolgozatomban az előbbi, molekulatömeg szerinti nevezéktant használom). Ezek a minor LHCII komplexek szerkezetileg hasonlítanak az LHCII-höz, de sokkal erősebben kapcsolódnak a PSII-höz. Körülményektől függően mind a PSII-vel, mind az LHCII-vel izolálhatóak (Crofts és Yerkes, 1994). A CP26 és CP29 komplexeknek a kl-b tartalma kisebb, a CP24 komplexé nagyobb, mint az LHCII-é.

Több laboratóriumban foglalkoznak a karotenoidok különböző fénybegyűjtő klorofill-protein komplexek közötti eloszlásával (Dainese és mtsi, 1992; Bassi és mtsi, 1993; Gilmore és Yamamoto, 1993) A violaxantin, ami az anteraxantin és zeaxantin prekursora a xantofill ciklusban, legnagyobb mennyiségben a CP29, CP26 és CP24 komplexben fordul elő (Horton és mtsi, 1996).

### ***2.5. Az LHCII, a PSII perifériális antennája***

Az LHCII a pigment-protein komplexek közül legnagyobb mennyiségben előforduló, a PSII-vel asszociált fénybegyűjtő klorofill a/b protein komplex, amely a zöld növények kl-a molekuláinak közel felét és a kl-b molekulák döntő hányadát tartalmazza.



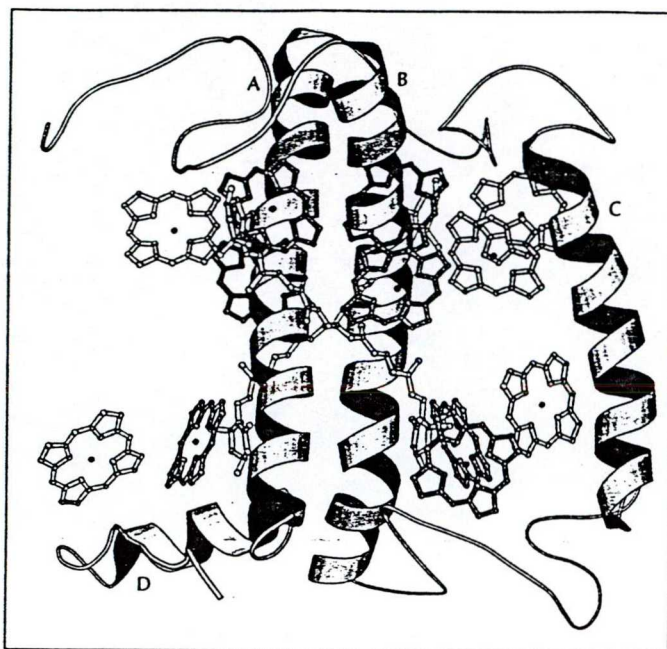
Az LHCII a fotoszintézis szempontjából késői termék. A fotoszintetikus prokarioták, a proklorofiták kivételével, egyáltalán nem tartalmazzak kl-b-t. Az LHCII alapvető fotofizikai funkcióján kívül, fontos szerepet tölt be a gránumos struktúra fenntartásában, mind a membránon belüli packing, mind pedig az egymással szemben lévő tilakoid membránok összetapadása révén - stacking (Staehelin, 1976; Mullett és Arntzen, 1980; Garab és mtsi, 1991). Nem kevésbé fontos szerepet játszik a komplex a hosszútávú akklimatizációs és a rövidtávú adaptációs folyamatokban sem (Anderson és Andersson, 1988).

Az LHCII monomer 232 aminosavból álló polipeptidet tartalmaz, 7 kl-a és 5 kl-b molekula (Kühlbrandt és mtsi, 1994), 2 karotenoid (lutein) és két különböző lipid foszfatidil-glicerol és digalaktozil-diacilglicerol kapcsolódik hozzá (Nussberger és mtsi, 1993). A polipeptid háromszor metszi át a tilakoid membránt. Két transzmembrán hélix 30°-os szöveget zár be a membránnal, 43 Å (A) és 51 Å (B) hosszúságúak. Nyolc klorofill kötőhelyet azonosítottak, ezek közül 5 az A és B transzmembrán hélixhez, 2 a rövidebb C hélixhez és 1 a D hélixhez kapcsolódik, amely a membrán lumen felőli oldalán található (2. ábra).

A két karotenoid molekulának a gerjesztési energia kl-a-ra továbbításában és a triplett állapotú klorofilok kioltása révén, a toxikus szinglet oxigén kialakulása elleni védelemben van fontos szerepe. Ezenkívül szerepe van a struktúra kialakításában is, az A és B hélix közötti kötések kialakítása révén merevebbé teszi a membránt.

Az LHCII komplex natív, funkcionális formája a monomerek alkotta trimér. A monomerek közötti kötés a polipeptidek különböző részei között alakul ki, a C hélixen ill. a B hélix felső végén keresztül és az amino- és karboxil terminális végeken

keresztül, ezenkívül néhány klorofill molekula is részt vesz a monomérek összetartásában (Kühlbrandt, 1994).



2. ábra Az LHCII szerkezete és elhelyezkedése a membránban (Kühlbrandt, 1994).

A növények hosszútávú adaptációs képességüknek köszönhetően, a nevelés során alkalmazott fényintenzitás függvényében alakítják antennaméretüket. Általában a napfényen nevelt növények antenna mérete kisebb, mint az árnyékban lévőké. Ilyen különbség egyazon fajtán belül ill. ugyanannak a levélnek fény és árnyék oldala között is megfigyelhető (Anderson és Osmond, 1987; Anderson és Andersson, 1988). A fényadaptáció során a PSII antennarendszerében bekövetkező változások elsősorban a perifériális LHCII populációt érintik; alacsony fényben megnő a perifériális LHCII populáció aránya a belső populációhoz képest (Maenpaa és Andersson 1989).

A rövidtávú fényadaptációs folyamatok is az LHCII perifériális régióját érintik. Erős fényben a PSII-ről több elektron érkezik, mint amit a PSI fogadni képes, így a

plasztokinon molekulák redukált állapotba kerülnek, az LHCII foszforilációjáért felelős kináz a citokróm b<sub>6</sub>/f komplexen keresztül aktiválódik. A foszforiláció hatására (a felületen lévő negatív töltések számának növekedése által) a perifériális LHCII egy része leválik a PSII-ről, csökkentve annak antenna méretét, így helyreállítva a két fotoszisztéma közötti egyensúlyt. A plastokinon molekulák oxidált állapota - defoszforiláción keresztül - fordított irányú folyamatot hoz létre (Bennett, 1991; Allen, 1992).

## **2.6. CD spektroszkópia**

A cirkuláris dikroizmus (CD), a balra és jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciójának különbsége. Igen hatásos spektroszkópia módszer biológiai minták szerkezetének vizsgálatához. A biológiai rendszerekben szintetizált molekulák döntő többsége optikailag aktív, ún. intrinzikus CD sávokkal rendelkeznek, amely a molekula aszimmetrikus szerkezetéből származtatható. Kis méretű komplexekben a CD sávok rövidtávú kölcsönhatásokból származnak (pl. a dimer kromofórijai közötti kölcsönhatások). Makromolekuláris aggregátumokban pl. psi-DNS-aggregátumokban továbbá egyes organellekben pl. vírusokban vagy kromoszómák esetén a CD jel általában egy-két nagyságrenddel is erősebb, mint az őket összetevő kisebb egységekben. A jelintenzitás növekedése mellett a jelalak is lényegesen megváltozik, a „klasszikus”, exciton-felhasadást mutató spektrumokhoz képest „anomáliákat” mutat. Makromolekuláris aggregátumok anomális CD jele alapján a szerkezeti paraméterek pontos meghatározására ma még nincs lehetőség. Az azonban megállapítást nyert, hogy

az anomális CD olyan molekuláris makrostruktúrák létezéséhez köthető, melyekben a kromofórok valamilyen helikális rendben helyezkednek el és a makroaggregátumok mérete a fény hullámhosszával összemérhető. Az ilyen makromolekulák CD sajátosságai a psi-típusú CD elmélettel írhatók le.

1986-ban Keller és Bustamante a kisméretű molekuláris rendszerek '60-as években kidolgozott CD elméletét kiterjesztette makromolekuláris rendszerekre. A psi-típusú CD elmélet lényege abban fogható meg, hogy a makromolekuláris aggregátumokban a nagy kromofórsűrűségnek és a hosszútávú rendezettségnek köszönhetően a rövid hatótávolságú kölcsönhatások mellett a CD kialakításában számottevő szerepet játszanak a hosszútávú kölcsönhatások is. Királisan rendezett makromolekulákban ezen - egyébként nagyon gyenge CD-t eredményező - kölcsönhatások igen nagy számban fordulhatnak elő, ezért rendezett struktúrákban dominánssá válhatnak.

Az elmélet szerint a psi-típusú CD jel amplitúdója - azonos királis rend mellett - a makroaggregátumok méretével arányos (Keller és Bustamante, 1986). Ezt LHCI makroaggregátumokban és tilakoid membránokban is sikerült kimutatni (Barzda és mtsi, 1994). Az elmélet szerint a makroaggregátumokban a gerjesztési energia - kedvező esetben - az aggregátumok egészére is kiterjedhet (Keller és Bustamante, 1986). Barzda és mtsi (1996a) az LHCI psi-típusú anomáliát mutató aggregátumaiban kimutatták a gerjesztési energia nagy távolságokra való vándorlását.

## **2.7. A klorofill molekulák CD spektruma különböző rendszerekben**

A planáris, majdnem szimmetrikus tetrapirrol molekulák CD jele igen gyenge. Klorofill molekulát tartalmazó pigment-protein komplexek CD spektruma ezzel szemben kb. egy nagyságrenddel erősebb hasadt sávokat tartalmaz, amely sávok exciton kölcsönhatásokból származnak. CD mérések segítségével így a pigmentek rövid hatótávolságú kölcsönhatásáról nyerhetők információk. A 70-es években Faludi-Dániel Ágnes munkacsoportjában (1973) megállapították, hogy az LHCII tartalmú membránok és az LHCII aggregátumok rendkívül intenzív, anomális alakú CD sávokkal rendelkeznek. A jel nagysága a membránok LHCII tartalmával párhuzamosan növekedett (Faludi-Dániel és Mustárdy, 1983). Ezen anomáliák értelmezése hosszú ideig nem volt lehetséges. Sokan az anomális CD-t artefaktumnak minősítették.

Különböző vizsgálatokkal (cirkulárisan poláros fény differenciális szórás (CIDS) sajátosságok, CD mikroszkópos leképzések és CD mikrospektrometria (Garab és mtsi, 1988c)) sikerült megállapítani, hogy a CD az izolált LHCII aggregátumokban ill. a kloroplasztiszban királisan rendezett makrodomének jelenlétének köszönhető. A makrodomének méretét CIDS mérések és differenciális polarizációs mikroszkópia alapján 200-400 nm-nek találták (Garab és mtsi, 1988c; Finzi és mtsi, 1989). K1-b hiányos árpa mutáns (chlorina-f2) és vad típusú kloroplasztisz CD és CIDS spektrumainak összehasonlításával megállapították, hogy a makrodomének kialakulásában fontos szerepe van az LHCII polipeptidnek (LHCII hiányában lényegesen kisebb jelet kaptak) (Garab és mtsi, 1991).

Fiatal búzalevelek tilakoid membránjában, ahol az LHCII tartalom diurnális ciklus szerint változik, a perifériális LHCII komplexek szintézise elősegíti a



makrodomének szerveződését és a CD jel növekedését, amely arra utal, hogy a makrodomének kialakulásában a perifériális LHCI komplexek játszanak fontos szerepet (Busheva és mtsi, 1991; Liker és Garab, 1995).

Kimutatták továbbá, hogy tilakoid szuszpenzióhoz szorbitot adva, főleg a 688 nm és az 515 nm-es CD csúcs amplitúdója nő meg, a 674 nm-es negatív csúcs gyakorlatilag érzéketlen a szorbit koncentrációjára. Ezzel ellentétben  $Mg^{2+}$  ion hozzáadásával a 674 nm-es csúcs növelhető jelentősen és az 515 és 688 nm-es csúcs alig változik. Emellett a CD jel 430-500 nm között a negatív tartomány felé tolódik el. Úgy tűnik, hogy a CD spektrum kialakulását és ezzel együtt a makrodomének szerveződését két külső faktor szabályozza: (i) a kétértékű ionok árnyékoló hatása, amely a stackinget (a membránok összetapadása) erősíti; (ii) a közeg ozmotikus nyomása, amely a laterális (membránon belüli packing) kapcsolatot segíti elő (Garab és mtsi, 1991).

Korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy az LHCI részt vesz a membrán stacking kialakításában (Mullett és Arntzen, 1980). A makrodomén szerveződés a PSII partikulumok önaggregációs képességének tulajdonítható, ami a perifériális LHCI komplexek adhéziójával magyarázható. A PSII molekulák aggregációja egy közel homogén membránrégiót eredményez, amelyben a PSII feldúsul és gyakorlatilag nem tartalmaz PSI partikulumokat, így a PSI és PSII laterális szétválásához vezet (Garab és mtsi, 1991; Barzda és mtsi, 1994).

Az LHCI makrodomének struktúra-stabilizáló szerepe összefüggésbe hozható azzal, hogy az izolált LHCI megfelelő körülmények között (kationok jelenlétében) folyadékkristályos szerkezetet alakít ki (Mullett és mtsi, 1984; Kühlbrandt, 1984). A membránba ágyazott makrodomének és az LHCI folyadékkristályos szerkezetű

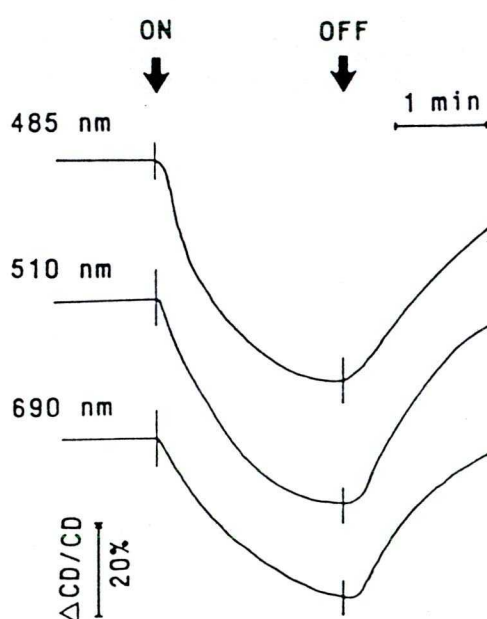
formájának CD tulajdonságai hasonlóak (Faludi-Dániel és Mustárdy, 1983; Garab és mtsi, 1988a).

## **2.8. Fényindukált CD változások**

Gregory (1975) figyelte meg először, hogy a kloroplasztisz tilakoid membrán néhány százalékos nagyságú fényindukált CD változást mutat, amely függött a lineáris elektrontranszport működésétől. Faludi-Dániel és mtsi (1984) szintén azt találták, hogy a fényindukált CD változás a lineáris elektrontranszport akceptorával serkenthető, míg DCMU-val gátolható, de működtethető a PSI körüli ciklikus elektrontranszport révén is (DCMU, PMS és Na-aszkorbát jelenlétében). Azt találták továbbá, hogy a fényindukált CD változások érzékenyek a  $\Delta pH$ -ra, de nem gátolhatók a transzmembrán teret lecsengető ágensekkel, pl. valinomicinnel. A fény-mínusz-sötét különbségi spektrumok alapján azt a következtetést vonták le, hogy a változások a rövid hatótávolságú klorofill-klorofill kölcsönhatásokban következnek be.

Garab és mtsi (1988b) kimutatták, hogy a fényindukált CD változás szerkezeti átrendeződésekből származik, amely azonos következményekkel jár valamennyi pigmentet illetően. Azonos kinetikájú változások voltak mérhetőek a karotenoidok, a kl-a és a kl-b megfelelő spektrumtartományaiban (485, 510 és 690 nm-nél) (3. ábra). A szerkezetváltozások általános - és nem egy-egy pigment pár - részvételét mutatta az is, hogy azok a differenciális fényszórás komponens segítségével is kimutathatók voltak, pl. 540-560 nm-en, vagy a 720 nm feletti tartományban. Ezért Garab és mtsi (1988b) - támaszkodva azon eredményekre is, amely az abszorpciós eredetű (exciton) CD sávokra

szuperponálódott differenciálpolarizációs jel királis makrodoménekből való származását mutatta (Garab és mtsi, 1988a) - arra a következtetésre jutottak, hogy a CD változások egy általános szerkezeti átrendeződésből származnak, melynek során a királis makroszerkezet változik meg. Az is megállapításra került, hogy ezek a változások sokkal specifikusabbak, mint az ezeket kísérő, általában kisebb (nem differenciálpolarizációs) fényszórás változások és kinetikájukban is eltérnek azoktól.



3. ábra A fény-indukált CD változás nagysága és kinetikája három különböző hullámhosszon (Garab és mtsi, 1988b).

Ezen vizsgálatok azt is megállapították, hogy ezek a szerkezetváltozások fokozatosan egyre intenzívebbé tehetők és nagyságuk a 80 %-ot is elérheti - jóllehet ilyen változások a fotoszintetikus elektrontranszport számlájára nem írhatók. Nigericinnel,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -dal és imidazollal végzett mérések segítségével - a korábbi eredményekkel jó egyezésben - az találták, hogy a fényindukált CD változások

érzékenyek a  $\Delta\text{pH}$ -ra, de azt is megállapították, hogy azzal közvetlenül nem korrelálnak. (A  $\Delta\text{pH}$  gyors lecsengetése nem befolyásolja a fényindukált CD változás lecsengését.) A  $\Delta\text{pH}$  ezen szerepének ugyanakkor ellentmondani látszott az, hogy az gramicidinnel nem vagy csak alig volt gátolható. Ferricianid hozzáadása után végzett mérések ( $\text{O}_2$  fejlődés és fényindukált CD változás) azt jelezték, hogy a szerkezetváltozások és a fotokémiai aktivitás között közvetlen összefüggés nincs. A szerzők ezért azt a következtetést vonták le, hogy a változásokat végső soron a fotokémiailag kialakított  $\Delta\text{pH}$  és/vagy a fotokémiai apparátus működését kísérő lokális iongradiensek kialakulása „hajtja”. Ez a mechanizmus lényegében nagyon hasonló a korábbi  $\Delta\text{pH}$ -val összefüggő - és pl. fényszórásként detektált - szerkezetváltozások értelmezésére javasolt mechanizmusokhoz (Briantais és mtsi, 1980), vagy a  $\Delta\text{pH}$ -tól függő fluoreszcencia kioltás mechanizmusához (v.ö. Horton és mtsi, 1996). A fényindukált CD változás ezen jelenségekkel való kapcsolata nem ismert. A CD változások a királis rendezettségre vonatkozóan specifikus, közvetlen szerkezeti információt hordoznak, amelyek ezért jól használhatók a fotofizikai apparátus szerkezeti változásainak követésére.

### ***2.9. A fénygátlás elleni védekezés***

A fénybegyűjtő komplex pigmentjeinek molekuláris rendezettsége biztosítja a hatékony energiaátadást a reakciócentrumok felé, így a fotoszintézis már alacsony fényintenzitáson is képes magas hatásfokkal működni. Ennek következménye, hogy magas fényintenzitáson az elnyelt fényenergia mennyisége nagyobb, mint amit a

növény fotoszintetikus hasznosítani képes és a fotoszintetikus szisztéma fényindukált károsodást szenvedhet. Ilyen körülmények között a növény a gerjesztési energia disszipációjával védi meg magát a fénygátlással szemben, amely mint nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás mérhető ( $q_N$ ) (Horton és mtsi, 1996).

Többféle nem-fotokémiai kioltást ismerünk, amelyek egymástól a relaxációs kinetikájuk alapján különböztethetők meg (Demmig és Winter, 1988; Horton és Hague, 1988; Walters és Horton, 1991). Leveleken - magas fény mellett - a legfontosabb kioltás az energiafüggő nem-fotokémiai kioltás ( $q_E$ ), amelynek relaxációs ideje néhány másodperctől percekig tarthat. A  $q_E$  szorosan kapcsolódik az elektrontranszport során a tilakoid membrán két oldala között kialakult pH különbséghez. (Briantais és mtsi, 1979; Wraight és Crofts, 1979; Krause és mtsi, 1982).

Többféle - egymást nem kizáró - elképzelés létezik az erős megvilágítás során bekövetkező disszipációs folyamatokra vonatkozólag. Ezek közül az alábbiak emelhetők ki:

(i) Donor oldali mechanizmus: az oxigén-fejlesztő komplex gátlása hozza létre a kioltást. Ez az inhibíció  $P680^+$  kialakulásához vezet, amely maga a kioltó (Schreiber és Neubauer, 1990; Krieger és mtsi, 1992).

(ii) Akceptor oldali mechanizmus: A kioltás a feofitin redukcióján keresztül jön létre. Amikor a plasztokinon „pool” teljesen redukált és a  $Q_A$  túlredukálttá válik, (kettős redukció) gyors disszipációs ciklus alakul ki a PSII körül és az elektronok a redukált akceptor komplexről visszajutnak a donor oldalra egy a citokróm  $b_{559}$ -et magába foglaló reakcióúton keresztül (Nedbal és mtsi, 1992).

(iii) Antenna mechanizmus: Az LHCIII aggregációs állapotának megvilágítás hatására bekövetkező változásán keresztül megy végbe a kioltás. Az utóbbi időben egyre több

bizonyíték van ennek a mechanizmusnak a megvalósulására (Horton és mtsi, 1991; Horton és mtsi, 1996). Dolgozatomban felsorolt eredmények is összhangban vannak azzal, hogy ilyen mechanizmus működik a növények erős fény elleni védekezése során.

Yerkes és Crofts (1992) megmutatták, hogy a kioltáshoz nem szükséges aktív PSII. Ebben a kísérletben a PSII felőli elektrontranszportot DCMU-val gátolták, a  $\Delta pH$ -t DAD (donor) és metilviologén vagy ferredoxin és NADP (akceptor) segítségével csak a PSI-en keresztül alakították ki. A fluoreszcencia hozamot mérve azt találták, hogy a kioltás nem függött az oxigén-fejlesztő enzim állapotától (a DCMU hozzáadása előtt 0 vagy 2 flash-t adtak a mintára). A kioltás mértékét nem befolyásolta, ha a PSII-t  $NH_2OH$  és DCMU hozzáadásával gátolták, vagy az oxigén-fejlesztő komplex proteinjeit Tris kezeléssel eltávolították.

A  $q_E$  maximális nagysága különböző fajokban változó. Értéke különösen olyan növények esetén magas, amelyek jól alkalmazkodnak extrém környezeti hatásokhoz (Horton és Ruban, 1992).

### *2.9.1. Bizonyítékok az LHCII-t magába foglaló kioltó mechanizmus létére*

(i) Mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektrumok vizsgálatával kloroplasztiszbán megállapították, hogy a  $q_E$  kialakulása közben a 680 és 700 nm-es LHCII antennára jellemző sáv intenzitása változik. Izolált LHCII esetében hasonló változások figyelhetők meg (Horton és mtsi, 1991).

(ii) Látszólagos abszorpció változás: Már több éve ismert, hogy a  $q_E$  összefügg a fényszórás változással - ezeket a változásokat általában 510 és 550 nm között

detektálták és úgy találták, hogy a  $\Delta pH$  kialakulásával kapcsolatosak (Deamer és mtsi, 1967). Kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a szórástranziensek nagyon hasonlítanak a  $q_E$ -re (Sivak és mtsi, 1985; Bilger és mtsi, 1988). Horton és mtsi (1991) kimutatták, hogy ha antimycin A-val gátolják a  $q_E$  kialakulását, akkor a fényszórás legfontosabb komponense 530 nm-en gátolt, és ez a változás a  $q_E$ -hez kapcsolódik. A fényszórás változásokat a tilakoid membrán szerveződésének változásából származtatták, nem pedig a PSII fotokémiájának speciális gátlásából (Krause, 1974).

(iii) Az antimycin A a  $q_E$  jól ismert gátlószere, amely gátolja a fényindukált fényszórás változást is, gátolva az LHCII makroaggregációját (Horton és mtsi, 1991; Horton és Ruban, 1992).

(iv) LHCII-t nem tartalmazó mutánsok: Kimutatták, hogy a  $q_E$  sokkal kisebb kl-b-t nem tartalmazó árpa mutánsokban és szabályozó hatása is kisebb a PSII fotokémiájára. (Genty és mtsi, 1990; Horton és Ruban, 1992)

### 2.9.2. A $\Delta pH$ szerepe

Általánosan elfogadott nézet szerint a  $q_E$  szorosan összefügg a  $\Delta pH$ -val ill. a  $q_E$ -t  $\Delta pH$ -függő kioltó mechanizmusnak tekintik (Briantais és mtsi, 1996; Horton és mtsi, 1996). Azonban nem ismert pontosan, hogy a  $\Delta pH$  milyen úton szabályozza a  $q_E$ -t.

A tilakoid lumen savasodása aktiválja a xantofill ciklust, a violaxantin zeaxantinná való deepoxidálását anteraxantinon keresztül. Másrészt a protonáció képes a PSII antenna vagy/és reakciócentrum pigment-protein komplexek konformációjának megváltoztatására. Izolált kloroplasztisz esetén a  $q_E$  a lumen savasodásától függ és a

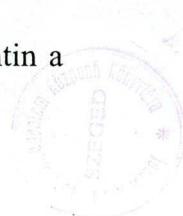
zeaxantin + anteraxantin mennyiségével arányos (Gilmore és Yamamoto, 1993). Az elektrontranszportlánc szétkapcsolói gátolják mind a  $q_E$ -t mind a deepoxidációt. A ditiotreitól (DTT) gátolja a deepoxidációt, csökkenti a  $q_E$ -t, ugyanakkor nincs hatással a kialakult pH különbségre (Gilmore és mtsi, 1995).

Az LHCII domének lumen oldalán számos glutamát és aszpartát csoport van (Karlín-Neuman és mtsi, 1985), amelyek protonálódni képesek a lumen savasodásával. A DCCD, amely kovalensen képes kötődni a hidrofób domének karboxil csoportjaihoz, gátolja a PSII-től függő lumen savasodást. Azt találták, hogy DCCD gátolja a  $q_E$ -t is (Ruban és mtsi, 1992). Ezen eredmények alapján, Horton és mtsi (1992) azt a hipotézist állították fel, hogy a  $q_E$  létrejöttéhez az első lépés az antenna komplexek protonálódása (valószínűleg a CP 29 protonálódása - amely a PSII „core” komplexéhez közelebb helyezkedik el), amely képes lehet az antenna polipeptidek konformációváltozását létrehozni.

Az a megfigyelés, hogy az LHCII-n a DCCD kötőhely egyben  $Ca^{2+}$  ion kötőhely is, szerepet tulajdonít a  $Ca^{2+}$  ionnak is a  $q_E$  létrejöttében (Webber és Gray, 1989). Megfigyelték továbbá, hogy a  $q_E$  kialakulása  $Ca^{2+}$  csatorna inhibitorokkal gátolható (Horton és Ruban, 1992). Ezek a kísérletek megerősítik az LHC minor antennakomplexek struktúraváltozásban betöltött szerepének jelentőségét.

### 2.9.3. A zeaxantin szerepe

Demmig-Adams (1990) kimutatta, hogy a violaxantin zeaxantinná történő átalakulása in vivo a  $q_E$  kialakulásával korrelál, és úgy gondolták, hogy a zeaxantin a





disszipáció szempontjából fontos vegyület. Ezzel szemben áll Noctor és mtsi (1991) megfigyelése. Kloroplasztiszt izoláltak levélből, amit előzőleg úgy kezeltek, hogy különböző arányban tartalmazza a violaxantint és a zeaxantint. A  $q_E$  kialakulásához szükséges  $\Delta pH$  a zeaxantin mennyiségének növekedésével arányosan csökkent. Kloroplasztiszban zeaxantinnal és anélkül kialakult  $q_E$  nagysága azonos volt. Vagyis a violaxantin zeaxantin átalakulás csak segít a  $q_E$  kialakulásában, amely azonban enélkül is létrejön (Rees és mtsi, 1989). Bár a xantofill ciklus szerepére vonatkozóan különbözőek az elképzelések, a fénygátlással szembeni védelem szempontjából való fontossága nem vitatható (Horton és mtsi, 1996).

Mivel a zeaxantin legnagyobb mennyiségben a CP24, CP26 és CP29 minor LHC komplexekben fordul elő, a zeaxantin-violaxantin átalakulás szerepe ezen komplexek jelentőségére utal.

### 3. CÉLKITŰZÉS

Korábbi eredmények szerint a tilakoid membránban az antenna pigment-protein komplexeket tartalmazó makrodomének biztosítják azt a szervezeti egységet (az egybefüggő, tó-szerű antennarendszert), amelyen belül az energiaátadás hatékonysága optimális. A makrodomének kialakulásában az LHCII fontos szerepet játszik. Megállapítást nyert az is, hogy az aggregáció függ a kationok jelenlététől és az ozmotikus nyomás is befolyásolja.

Az LHCII molekulák transzmembrán irányú összekapcsolódásának fontos szerepe van a gránumos szerkezetet stabilizálásában is. Továbbá az LHCII nagyfokú aggregációs készsége magyarázatul szolgál a két fotokémiai rendszer laterális elválasztására is. Ezen túlmenően az LHCII részt vesz mind a rövidtávú energiaeloszlás szabályozásában, mind pedig a hosszabb távú adaptációs folyamatokban is.

Mivel a gerjesztési energia hasznosítása ill. disszipációja és főleg ennek szabályozása nem ismert teljességében, igen fontos feladat az LHCII-t tartalmazó makrodomének szerkezeti dinamikájának vizsgálata.

A feladat elvégzéséhez rendelkezésünkre áll egy hatékony módszer, a fényindukált CD változás mérése, amely segítségével a tilakoid membrán makrodoménjeinek szerkezetváltozása jól követhető izolált kloroplasztiszokon.

A makrodomén aggregáció állapotának és szerkezeti dinamikájának vizsgálata csoportunkban három szálon haladt:

- in vivo körülmények között, izolált kloroplasztiszon
- in vitro, izolált LHCII pigment-protein komplexeken

- in vitro, izolált LHCII komplexeken a lipid környezet függvényében

Dolgozatomban az izolált kloroplasztiszton végzett munka eredményeit mutatom be.

Csoportunkban végzett korábbi vizsgálatok eredményei alapján azt a következtetést vonták le, hogy a makrodomének szerkezetváltozása a fotoszintetikus elektrontranszport működésétől ill. a fotokémiailag generált transzmembrán pH különbségtől függ. A makrodomének szerkezetváltozásának természetéről azonban kevés információ állt rendelkezésünkre ill. az eredmények értelmezése sem volt kielégítő, ill. nem volt mentes ellentmondásoktól (ti. a  $\Delta\text{pH}$  és az elektrontranszport szerepét illetően). Ezért és feltételezhető regulációs (fényadaptáció) szerepe miatt vált szükségessé a fényindukált CD változással detektálható szerkezetváltozások szélesebb körű jellemzése.

Munkám során a következő témaköröket vizsgáltam:

- az elektrontranszport és a fényindukált CD változás közötti kapcsolat
- különböző kationok hatása a fényindukált CD változásra és ezzel összefüggésben a membránon keresztüli iontranszport szerepe
- a fényindukált CD változás hőmérséklet függése
- különböző gátlószerek hatása a fényindukált CD változásra, különös tekintettel azokra, amelyek a  $q_E$ -t gátolják
- olyan folyamatok és a fényindukált CD változás kapcsolatának vizsgálata, amelyek kialakulásában az LHCII struktúraváltozása szerepet játszhat (membrán permeabilitás, foszforiláció)

Munkám szorosan kapcsolódik a munkacsoportunkban folyó, másik két témához, amelyekkel több oldalról közelíthető meg a makroaggregáció szerepe és jelentősége. Ezeket részben felhasználtam a munkám során.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Növényi anyag

A kísérletekhez üvegházi körülmények között nevelt, kéthetes borsó (*Pisum sativum* L.) növényekből izolált kloroplasztiszt és tilakoid membránt használtam.

#### 4.1.1. Intakt kloroplasztisz

A lecsipegetett leveleket ollóval összeaprítottam és konyhai mixerbe raktam annyit, hogy az izoláló médium (0,35 M szorbit, 20 mM tricin/KOH (pH 7,7), 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>) ellepje (Garab és mtsi, 1988b). A leveleket legkisebb fordulaton háromszor 5 s-ig aprítottam, majd a durva szuszpenziót 20 µm-es, 8 rétegű nylon szűrőn választottam el a fel nem tárt részekről. Ezután centrifugálással (1 perc, 500 g) eltávolítottam a törmeléket. Az intakt kloroplasztiszt újabb centrifugálással leülepttettem (1 perc, 1500 g). Az üledéket ecsettel, óvatosan szuszpendáló médiumban (0,35 M szorbit, 1 mM tricin/KOH (pH 7,7)) felsuszpendáltam és ismét leülepttettem (1 perc, 1500 g). Az üledéket 0,35 M szorbit, 20 mM tricin/KOH (pH 7,7), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl tartalmú médiumban ismét felsuszpendáltam és a kloroplasztiszt a mérés megkezdéséig ebben tároltam. A méréseket, ha ezt külön nem említem, ugyanebben a pufferben végeztem.

Az izolálás során minden műveletet 4 °C-on végeztem. Az intakt kloroplasztisz kb. 6 órán keresztül volt felhasználható.

#### *4.1.2. Tilakoid membrán*

A tilakoid membránokat intakt kloroplasztiszból ozmotikus feltöréssel nyertem. Törő pufferként 20 mM tricin/KOH (pH 7,7), 5 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú médiumot használtam. Az ozmotikus feltörés közvetlenül a mérés előtt, a küvetében történt. A feltörés után a mintához azonos térfogatú 0,7 M szorbit, 20 mM tricin/KOH (pH 7,7) és 5 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú puffert adtam, így a méréseket az intakt kloroplasztisznál leírt médiumban végeztem.

Mind az intakt kloroplasztiszt, mind pedig tilakoid membránt használva, a mintát a mérések előtt 5 percig sötétben tartottam, így minden mérésnél hasonló sötét adaptált állapotból indulhattam ki.

#### *4.2. Műszeres mérő módszerek*

##### *4.2.1. A klorofill tartalom meghatározása*

A klorofill tartalom meghatározása Arnon (1949) módszerével történt. A kloroplasztisz szuszpenziót 80%-os acetona téve a mérést zavaró fehérjék kicsapathatók és centrifugálással eltávolíthatók. A kl-a és b abszorpcióját 664 és 646

nm-en mértem ( $A_{664}$  és  $A_{646}$ -ként jelölve). A spektrofotométert 720 nm-re nulláztam.

A kl-(a+b) tartalom az alábbi módon számítható:

$$Kl(a + b) = (8.02 \cdot A_{664} + 20.2 \cdot A_{646}) \cdot 0.1$$

A mérés során 10 ml 80%-os acetonban 100  $\mu$ l kloroplasztisz abszorbcióját mértem. Így a végeredményként kapott kl-(a+b) koncentrációt mg/ml egységben kaptam.

#### 4.2.2. *Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia*

A CD spektrumokat Jobin Yvon CD6 dikrográffal vettük fel, a klorofill tartalom mind az intakt kloroplasztisz, mind a tilakoid membrán esetében 20  $\mu$ g/ml volt.

A fényindukált CD mérések elvégzéséhez a gerjesztő fényt a merőfény irányára merőlegesen fókuszáltam a mintára. A fotoelektronsokszorozó előtt Corning 2-64 vörös szűrőt, a gerjesztő fénysugárban Corning 4-96 kék szűrőt helyeztem el. A 600 nm alatti méréseknél a két szűrőt megcseréltem. A gerjesztő fényt egy 650 W-os wolfram lámpa fényéből, vízsűrő és a már említett üvegsűrő közbeiktatásával nyertem. A gerjesztő fény intenzitása 500 W/m<sup>2</sup> volt, ha a kísérleteknél külön nem emelem ki.

A fényindukált CD változásokat 510, 690 és 670 nm-en vizsgáltam, három perces fény-sötét ciklusokban. A CD változások kinetikája az alkalmazott hullámhosszokon egymással megegyező volt és gátlószerek jelenlétében különböző hullámhosszokon azonos mértékű gátlást kaptam. Megjegyzendő, hogy a 670 nm-es

csúcs negatív, így ennek abszolút értéke változott hasonlóan, mint a pozitív csúcsok intenzitása. Az eredmények ismertetésénél általában az 510 nm-en mért változásokat mutatom be.

#### *4.2.3. Fényindukált fényszórás mérés*

A fényindukált fényszórás változást Shimadzu UV 3000 kétsugaras spektrofotométerrel mértem, két-hullámhossz üzemmódban. A mintára két különböző hullámhosszúságú fényt bocsátottam (505 és 545 nm) és ennek különbségét detektáltam. A mérés körülményei megegyeztek a fényindukált CD változásnál leírtakkal, a különbség hogy a klorofill koncentráció 40 µg/ml volt.

#### *4.2.4. A fényindukált fluoreszcencia kioltás mérése*

A fényindukált fluoreszcencia kioltás mérésére Walz PAM 103 kl-fluorimétert használtam. A mérés feltételei a fényindukált CD változás mérésénél leírtakkal megegyezők, azzal a különbséggel, hogy a sötét periódusban rövid idejű, a megvilágító fényel megegyező intenzitású fényimpulzusokat adtam a mintára. A minta klorofill koncentrációja 5 µg/ml volt.



#### 4.2.5. Az elektrontranszport sebességének mérése

A fotoszintetikus elektrontranszport sebességét Hill-reakció mérésével határoztuk meg, víztől ferricianidig. Az alkalmazott módszer az akceptor redox állapotának változásán alapul. Az abszorpcióváltozás mérésére a korábban említett Shimadzu UV 3000 spektrofotométert használtam, kétsugaras üzemmódban. A mérés során a minta klorofill koncentrációja 10 µg/ml volt és 1 mM ferricianidot tartalmazott. A mérést 420 nm-en végeztem. Szétkapcsolóként („uncoupler”-ként) 10 mM NH<sub>4</sub>Cl-ot használtam.

#### 4.2.6. A ΔpH mérése

A membrán két oldala között kialakult pH különbséget 20 µM neutral red indikátor jelenlétében mértem, Shimadzu UV 3000 spektrofotométerrel, 553 nm hullámhosszon (Junge és mtsi, 1979). A minta klorofill koncentrációja 30 µg/ml volt.

#### 4.2.7. A Mg<sup>2+</sup> ion felszabadulásának mérése

A Mg<sup>2+</sup> ion sztróma oldali koncentrációnövekedését Eriochrome Blue SE metallokróm indikátorral határoztam meg. A méréshez 0,35 M szorbit, 10 mM NaCl, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Na-acetát és 40 mM HEPES/NaOH (pH 7,7) médiumot használtam. Az Eriochrome Blue SE koncentrációja 0.1 mM, a klorofill koncentráció

30 µg/ml volt. A mérést 554-592 nm-nél, Shimadzu UV 3000 spektrofotométerrel végeztem. Ez a hullámhossz igen szelektív a változásra. Kisebb és különböző kinetikájú fény/sötét jelet kapunk az indikátor hiányában, amely a  $q_E$  fényszórás változásához köthető. A  $Mg^{2+}$  ion transzport az Eriochrome Blue SE indikátor jelenlétében és hiányában kapott jel különbségével jellemezhető (Krause, 1977).

#### *4.2.8. A citokróm $b_{559}$ redox állapotainak és tranzienseinek mérése*

A citokróm  $b_{559}$  két formájának meghatározása spektrofotometriásan, a redukált és az oxidált forma abszorpciója alapján történt. Redukálószerként ditionitot és hidrokinont használtunk, míg az oxidálószer ferricianid volt. Míg a hidrokinon csak a citokróm  $b_{559}$  HP formáját képes redukálni, a ditionit mind a HP mind az LP forma redukációjára képes. A méréshez Shimadzu UV 3000 spektrofotométert használtam, két különböző hullámhosszúságú fényt bocsátva a mintára. A referencia hullámhossz 570 nm volt. A minta 77 µg/ml klorofillt tartalmazott. A mérés során először 559 nm-en megmértem a minta abszorpcióját (alpvonal), majd 0,4 mM ferricianidot adtam hozzá. 3 perc múlva, amely az egyensúlyi állapot eléréséhez volt szükséges, ismét megmértem a minta abszorpcióját 559 nm hullámhosszon (oxidált állapot), majd hasonlóan jártam el 1,5 mM hidrokinon és 5 mM ditionit hozzáadása után is. Ezek után egy újabb mintával ugyanezt a mérést 554 nm hullámhosszon is elvégeztem (Barabás és Garab, 1989).

A citokróm  $b_{559}$  koncentrációja a Beer-Lambert törvény alapján számítható. A következő egyenlet alapján a koncentrációt mM egységben kaptam.

$$[\text{cyt } b_{559}] = (A_{559} - 0.34 \times A_{554}) / 13.6$$

$A_{559}$ ,  $A_{554}$ : a redukált és oxidált forma abszorpciójának különbsége az adott hullámhosszon, a referencia hullámhosszhoz képest (Whitmarsh és Ort, 1984).

A citokróm  $b_{559}$  HP és LP formáját a megfelelő oxidált és redukált forma különbségeként számíthatjuk (Whitmarsh és Ort, 1984; Horváth és mtsi, 1996).

A citokróm  $b_{559}$  HP oxidált és redukált formájának arányának számítását szintén az előbb leírt mérés alapján végeztem.

#### 4.2.9. Az elektrokróm abszorpcióváltozás mérése

A mérőrendszerünkben (Barabás és mtsi, 1985) a küvettában lévő mintára egy monokromátorral 515 nm hullámhosszúságú fényt bocsájtottam. A gerjesztés két oldalról villanófénnyel történik, programban időzített módon. A mintán átjutó monokromatikus fényt egy fotoelektronsokszorozó detektálta, majd egy differenciál erősítőn keresztül egy sokcsatornás analízátorból átlagolással nyertem a villanófény indukált abszorpciós kinetikát. A mérések során a gerjesztés frekvenciája  $1 \text{ s}^{-1}$ , az ismétlések száma 20 volt.

## 5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

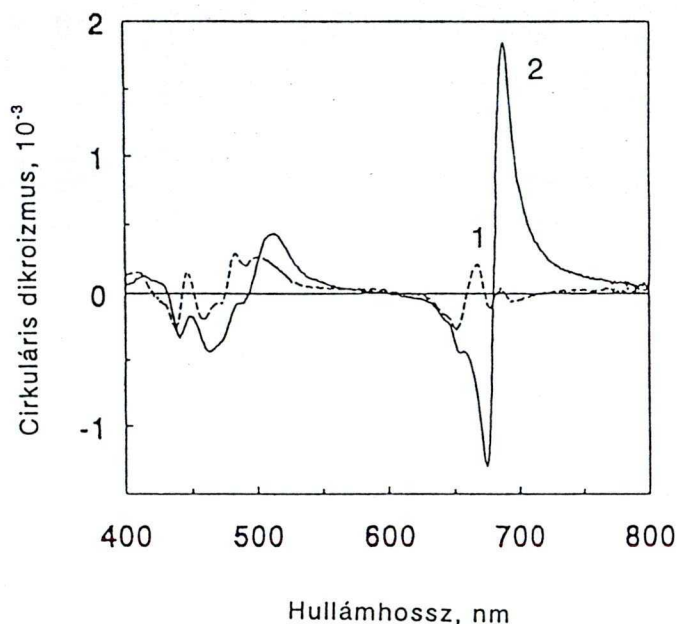
### 5.1. A makrodomén szerveződés szerepe

A 4. ábrán látható a kloroplasztisz CD spektruma 20 mM triclin (pH 7,7) tartalmú közegben és 0,35 M szorbit és 5 mM  $MgCl_2$  hozzáadása mellett. A két spektrum különbsége a királisan rendezett PSII partikulumok jelenlétéből származik (Barzda és mtsi, 1994). Gránumos kloroplasztiszban, a  $Mg^{2+}$  ionok elektrosztatikus hatásának ill. a szorbit ozmotikus nyomásának köszönhetően a szomszédos membránok között stacking és a membránokon belül packing kölcsönhatás jön létre az LHCII partikulumok adhézióján keresztül (Garab és mtsi, 1991). Ez a stacking és packing a makrodomének kialakulásához vezet. Hipotonikus (alacsony ozmotikus nyomású) médiumban alacsony ionerősség mellett nem alakul ki a makrodoménekre jellemző spektrum, a jel a pigment-protein komplexek közötti exciton, rövidtávú kölcsönhatásból származik (1-el jelzett spektrum).

A makrodoménekre jellemző psi-típusú CD spektrum három fő sávval rendelkezik, (+) 515, (-) 674 és (+) 688 nm-es csúcsokkal (4. ábra, 2. görbe). A sávok amplitúdója a minta ozmotikus nyomásának és kation koncentrációjának függvénye (Garab és mtsi, 1991).

A 5. ábra ezen minták fényindukált CD változását mutatja. Látható, hogy fényindukált CD változás csak a psi-típusú CD jellel rendelkező mintában, azaz makrodomének jelenlétében van. Tehát a makrodomének jelenléte feltétele a fényindukált CD változás létrejöttének. A fényindukált CD jel nagysága függ a médium

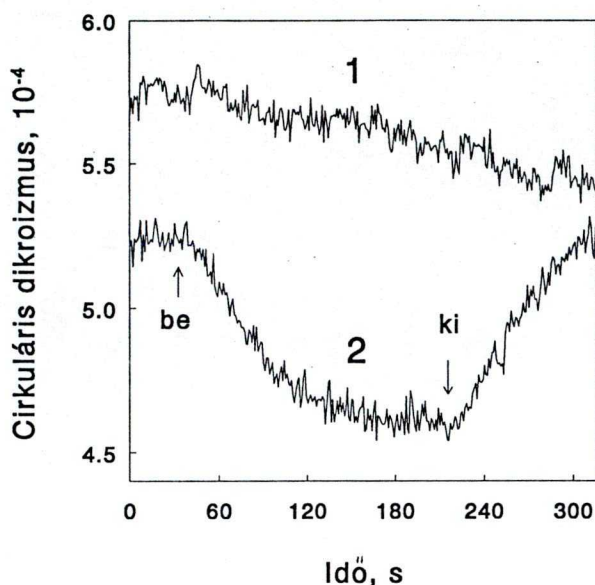
szorbit és kation tartalmától (az 5.7. fejezetben bővebben lesz szó róla), ill. függ magától a növényi mintától. Sajnos az üvegházban nevelt növények esetén nem mindig ugyanazok a nevelés körülményei (befolyásolhatják a kinti hőmérséklet és napfény stb.), így a fényindukált CD jel nagysága különböző minták esetén különböző, általában a CD amplitúdó 30-80 %-a volt.



4. ábra A kloroplasztisz CD spektruma 400-800 nm tartományban, 20 mM tricín (pH 7,7) (1) és 0,35 M szorbit, 20 mM tricín (pH 7,7) és 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú közegben (2). A klorofill koncentráció 20  $\mu g/ml$  volt.

Az a tény, hogy az exciton sávokkal rendelkező pigment-protein komplexek esetében nincs fényindukált CD változás, azt is mutatja, hogy a struktúraváltozás nem magukban a pigment-protein komplexekben játszódik le, hanem a partikulumból kialakult nagy doménekben, a pigment-protein komplexek közötti kölcsönhatás változásából ered. Ez jól egyezik a korábbi eredményekkel (Garab és mtsi, 1988b;

Barzda és mtsi, 1996b). A makrodomének jelenlétében a fényindukált CD változás legfőképpen a psi-típusú sávokat érinti, míg az exciton sávok változatlanok maradnak.

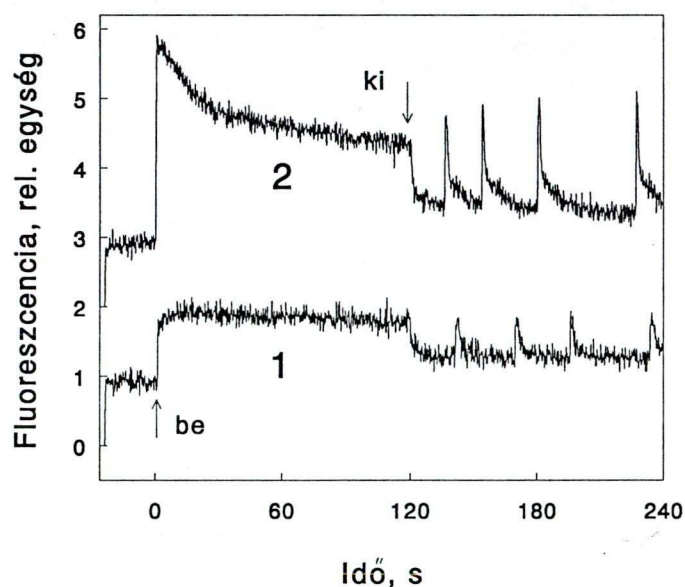


5. ábra A kloroplasztisz fényindukált CD változása 510 nm-en mérve, 20 mM tricín (pH 7,7) (1) és 0,35 M szorbit, 20 mM tricín (pH 7,7) és 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú közegben (2). A klorofill koncentráció 20  $\mu g/ml$  volt. A nyilak a megvilágító fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása  $500 W/m^2$  volt.

A fluoreszcencia hozam mérés szintén különbséget mutat a két minta esetében (6. ábra). Makrodomének jelenlétében a fényindukált CD változással együtt a fluoreszcencia hozam is szignifikáns változást mutat, azonban a fényindukált CD-vel ellentétben az alapállapot nem állítható vissza sötétben teljesen. Ugyanakkor, hipotonikus közegben, alacsony ionerősség mellett, amely a psi-típusú CD jel és a fényindukált CD változás hiányához vezet, reverzibilis fluoreszcencia hozam változás sem detektálható (6. ábra 1. görbe).

E két minta fluoreszcencia különbsége nem magyarázható a fotokémiai aktivitás változásával, amely a két mintánál lényegében azonos volt.

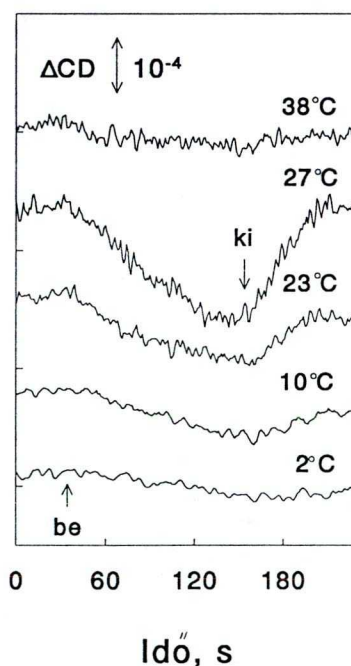
Ezen kísérletek alapján megállapítható, hogy LHCII-t tartalmazó tilakoid membránokban a fényindukált reverzibilis struktúraváltozás és az ezzel összekapcsolódó változás a fotofizikai reakcióútban csak a királis makrodomének jelenlétében figyelhető meg.



6. ábra A fluoreszcencia hozam változása intakt kloroplasztiszon 20 mM triclin (pH 7,7) (1) és 0,35 M szorbit, 20 mM triclin (pH 7,7) és 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú közegben (2). A minta klorofill koncentrációja 5  $\mu g/ml$  volt. A sötét periódusban néhány 1-2 s hosszúságú a gerjesztő fény intenzitásával megegyező intenzitású fényimpulzust adtunk a mintára. A nyilak a gerjesztő fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása  $500 W/m^2$  volt.

## 5.2. A makrodomének struktúraváltozásának hőmérséklet függése

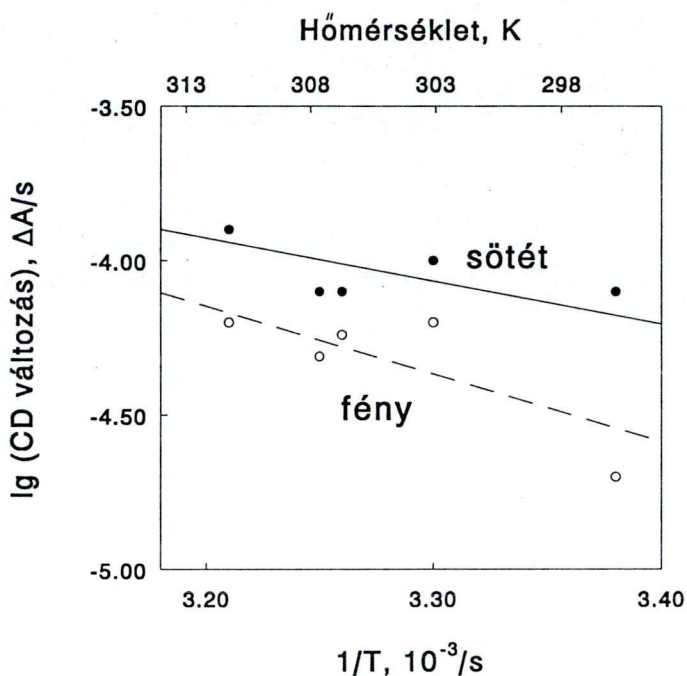
A fényindukált CD változás erős hőmérsékletfüggést mutat (7. ábra). A változás sebessége és amplitúdója, mind a fény bekapcsolása után, mind a sötét helyreállítás fázisában erősen függött a hőmérséklettől: 2 °C-tól kb. 30 °C-ig monoton növekedett a hőmérséklettel.



7. ábra A kloroplasztisz fényindukált CD változása az ábrán jelölt hőmérsékleteken 510 nm-en mérve. A nyilak a fény be- és kikapcsolását jelzik, intenzitása 500 W/m<sup>2</sup> volt. A klorofill koncentráció 20 μg/ml volt. A kinetikák egymáshoz képest eltoltak, így az ábra csak a relatív változásokat mutatja.

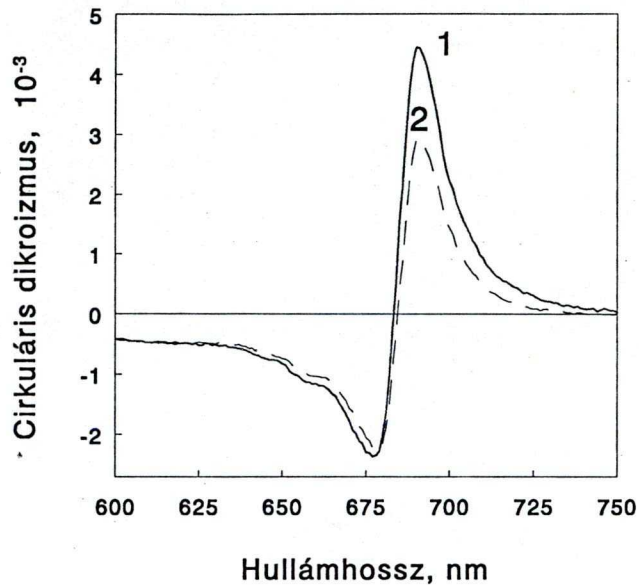


A fény hatására létrejött változás kezdősebességéből ill. a visszaalakulás sebességéből számolt aktivációs energia értéke 18.2 kJ/mól ill. 10.9 kJ/mól volt. (Az aktiválási energia kiszámításához az Arrhenius módszert használtam (Atkins, 1992) (8. ábra).)



8. ábra A fényindukált CD változás kezdeti sebességének hőmérséklet függése, a megvilágító fény bekapcsolásakor (fény) és kikapcsolásakor (sötét).

35-40 °C közötti hőmérsékleten a fényindukált CD változás hirtelen megszűnik. Ezzel szemben a psi-típusú CD sávok nem tűnnek el teljesen (9. ábra), még igen magas (45-50 °C) hőmérsékleten sem, bár jelentősen csökkennek, ugyanakkor a spektrum jellege változatlan marad.



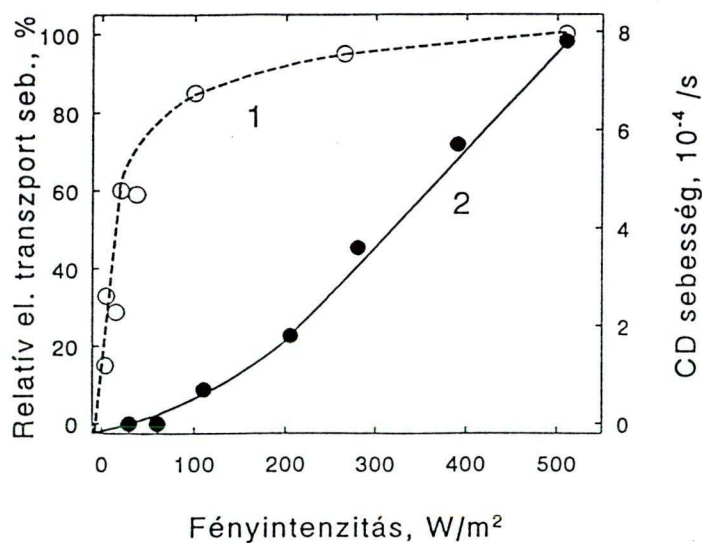
9. ábra A kloroplasztisz CD spektruma a vörös tartományban különböző hőmérsékleten, 27 °C (1) és 38 °C (2). A mérést 20 mM tricín (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20 µg/ml volt.

### 5.3. Az elektrontranszport és a fényindukált CD változás kapcsolata

Korábbi vizsgálatok (DCMU, ionofórok) a fényindukált CD változás és a fotoszintetikus elektrontranszport kapcsolatát mutatták (Gregory, 1975; Faludi-Dániel és mtsi, 1984; Garab és mtsi, 1988b). Ugyanakkor az az eredményünk, amely szerint izolált LHCII esetén is megfigyelhető fényindukált CD változás, ezzel ellentétben van (Barzda és mtsi, 1996b). Ezért további vizsgálatokat végeztünk a két folyamat kapcsolatának tisztázására.

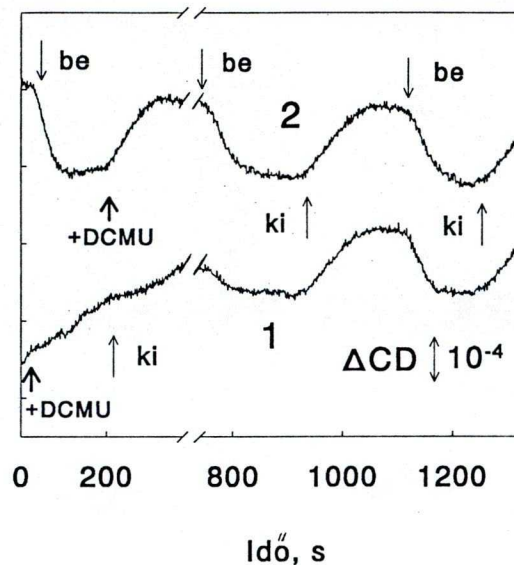
Első lépésként megmértük a fotoszintetikus elektrontranszport és a fényindukált CD változás fényintenzitás függését. Ahogy ez a 10. ábrán látható, az

elektrontranszport sebessége viszonylag alacsony fényintenzitáson maximálissá válik, míg a fényindukált CD változás főként erős fényen válik jelentőssé. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a struktúraváltozás szerepet játszhat az erős fényvel szembeni védekezés szempontjából. (Az erős fény hatására az antenna komplex struktúraváltozásának következtében megváltozhat a reakciócentrumba jutó gerjesztési energia mennyisége.) Az elektrontranszport és a struktúraváltozás telítésének itt leírt különbsége tehát azt mutatja, hogy e két folyamat nem kötődik szorosan egymáshoz.



10. ábra A fotoszintetikus elektrontranszport sebessége (1) és a fényindukált CD változás kezdősebessége (2) a megvilágító fény intenzitásának függvényében.

E két folyamat egymástól való függetlenségét erősíti meg a következő kísérlet is. 5  $\mu\text{M}$  DCMU, amely teljesen gátolja az elektron transzportot, nem minden esetben ill. csak speciális körülmények között gátolja a fényindukált CD változást (11. ábra).



11. ábra A fényindukált CD változás  $5 \mu M$  DCMU jelenlétében. (1) az első ciklus előtt adtuk a mintához a DCMU-t, (2) a DCMU-t az első fényciklus után adtuk a mintához. A két görbe egymáshoz képest eltolt, az ábra a relatív CD változást mutatja. A klorofill koncentráció  $20 \mu g/ml$  volt. A nyilak a fény be- és kikapcsolását jelölik, a megvilágító fény intenzitása  $500 W/m^2$  volt.

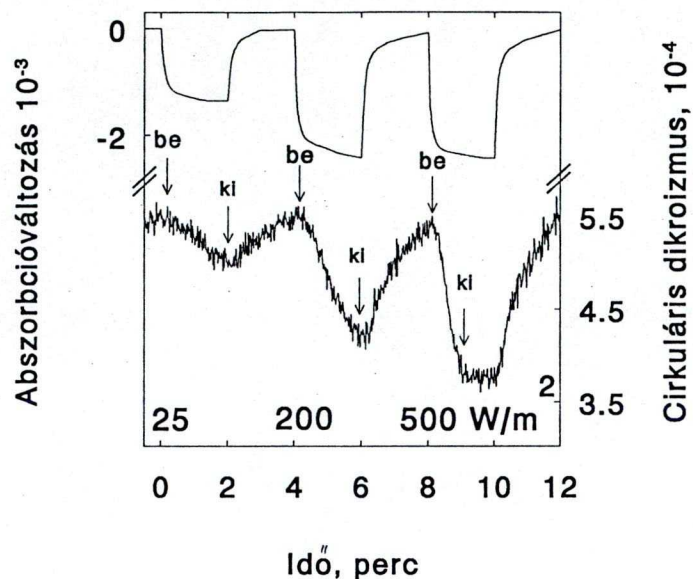
A fényindukált CD változást kétféleképpen mértük. Ha a minta sötét adaptációja után, közvetlenül a mérés előtt adtuk hozzá a DCMU-t, akkor az első sötét-világos ciklusban 100 %-os gátlást kaptunk, azonban a további ciklusok folyamán a gátlás mértéke csökkent és kb. a 4-5-ik ciklusnál a kontroll változásával megegyező amplitúdójú fényindukált jelet kaptunk. Ha az első fény-sötét ciklus után adtuk a kloroplasztisz mintához a DCMU-t, ekkor gyakorlatilag nem kaptunk gátlást, a kapott jel amplitúdója megegyezett a DCMU hozzáadása előtti jel amplitúdójával. Megmértük a fotoszintetikus elektrontranszport sebességét abban az állapotban, amikor a DCMU már nem gátolta a fényindukált CD változást. Azt találtuk, hogy az elektrontranszport

ebben az állapotban is gátolt volt. Ez a kísérlet bizonyítja, hogy a fényindukált CD változás kialakulásához szükségtelen a lineáris elektrontranszport lánc működése, de az elősegíti a szerkezetváltozásokat. A 11. ábra a változás jellegzetes menetét tünteti fel (1., 3., 4. fény-sötét ciklus).

#### *5.4. A transzmembrán $\Delta pH$ és a fényindukált CD változás kapcsolata*

Korábbi mérési eredmények (Garab és mtsi, 1988b) a transzmembrán  $\Delta pH$  és a fényindukált CD változás kapcsolatát mutatták. Ugyanakkor az előzőekben láttuk, hogy a makrodomének struktúráváltozása gyakorlatilag független a fotoszintetikus elektrontranszporttól. Ezen új eredmények szükségessé tették a  $\Delta pH$  és a struktúráváltozás kapcsolatának újravizsgálatát is.

Ugyanúgy, mint az elektrontranszport esetében, megvizsgáltuk e két folyamat fényintenzitás függését. Azt találtuk - amint az várható is volt - hogy a pH változás fényintenzitás függése megegyezik az elektrontranszportéval, ugyanolyan fényintenzitásnál válik maximálissá. Ugyanakkor a pH változás és a fényindukált CD változás felfutási és lecsengési kinetikája is különböző (12. ábra). A 12. ábrán három különböző fényintenzitáson kapott  $\Delta pH$  és fényindukált CD változás látható. Ez az eredmény azt mutatja, mint ahogy várható is volt, hogy a transzmembrán  $\Delta pH$  szorosan kapcsolódik a lineáris elektrontranszport működéséhez. Ugyanakkor viszont a struktúráváltozás sem a  $\Delta pH$ -hoz sem a lineáris elektrontranszport működéséhez sem köthető szorosan.



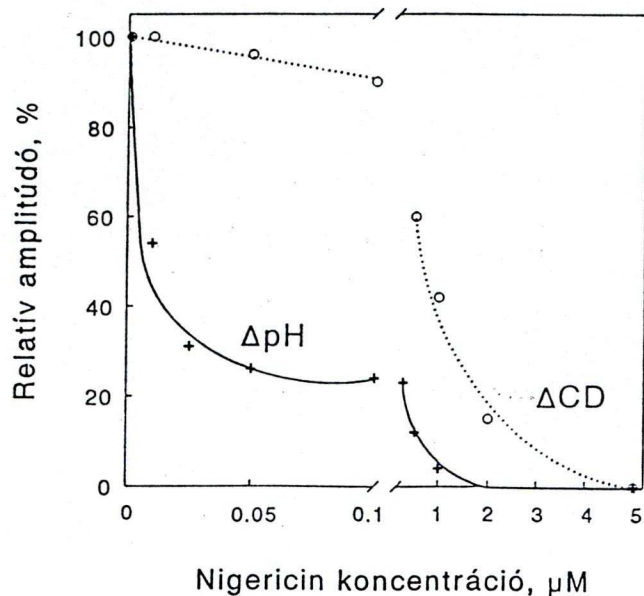
12. ábra A transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  és a fényindukált CD változás kinetikája 25, 200 és  $500 \text{ W/m}^2$  intenzitású megvilágító fény mellett. A nyilak a fény be- és kikapcsolását jelzik.

A következőkben nigericin jelenlétében vizsgáltuk a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  és a fényindukált CD változásként detektálható struktúraváltozás összefüggését.

Ahogy ez a 13. ábrán látszik, a nigericin sokkal kisebb koncentrációnál gátolja a  $\Delta\text{pH}$ -t, mint a fényindukált CD változás amplitúdóját. (A további kísérletek során - ha ezt külön nem mutatom be - a fényindukált CD változás gátlása mellett a CD spektrum lényegében változatlan, ahogy ez a 16. ábrán látható is.)

Ezen eredmények alapján tehát megállapíthatjuk, hogy nincs szoros összefüggést a makrodomének struktúraváltozása és a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  között.

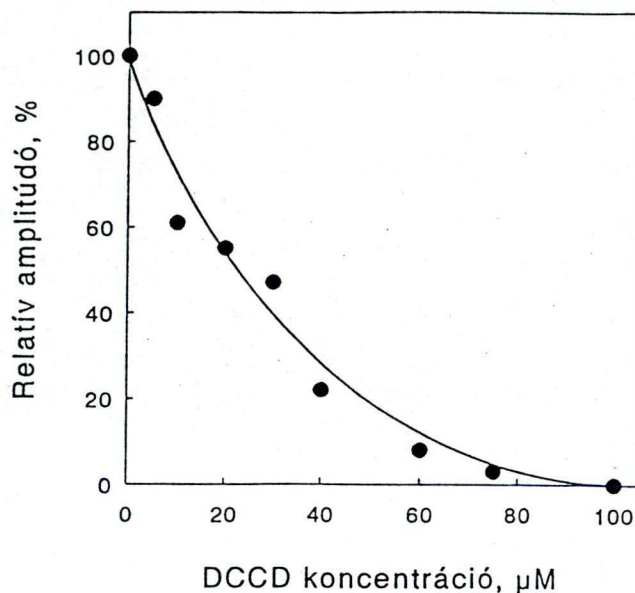




13. ábra A megvilágító fény hatására kialakult transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  és a fényindukált CD változás nagysága a nigericin koncentrációjának függvényében, tilakoid membránokon, azonos körülmények között mérve.

### 5.5. A DCCD hatása

A DCCD, az LHCII hidrofób domének szabad karboxil csoportjaihoz (glutamát, aszpartát) kötődve gátolja a proteinek protonálódását és ezzel együtt a proteinek konformációváltozását is. Ugyanakkor a fényindukált CD változást is gátolja, ahogy ez a 14. ábrán látható.



14. ábra A fényindukált CD változás nagysága a DCCD koncentrációjának függvényében intakt kloroplasztiszon. A mérést 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $\text{W/m}^2$  volt.

## 5.6. A makrodomének struktúraváltozásának gátlása kinon antagonistákkal

### 5.6.1. Az antimycin A és a myxothiazol hatása

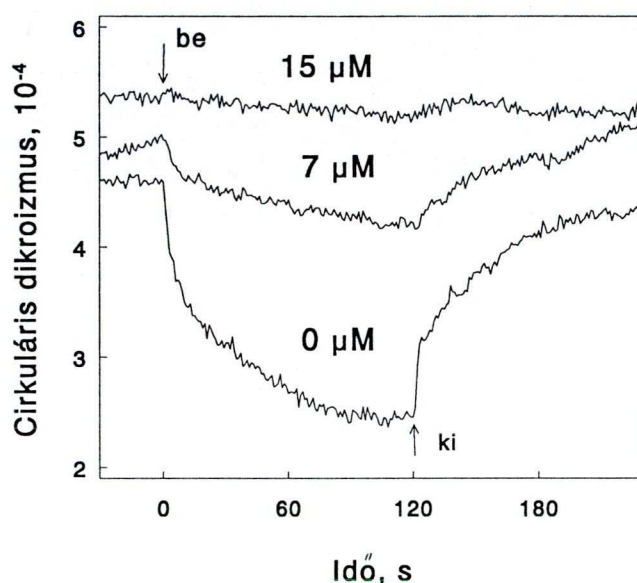
Munkám következő szakaszában megvizsgáltam különböző kémiai gátlók hatását a makrodomének struktúraváltozásának szempontjából.

Az antimycin A-ról ismert volt, hogy gátolja a  $q_E$ -t valószínűleg az LHCII konformációváltozásának gátlásán keresztül (Horton és Mtsi, 1991).



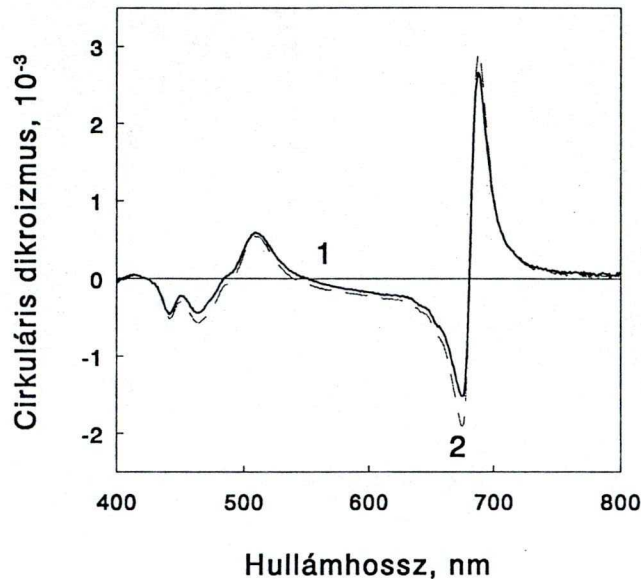
### 5.6.1.1. A fényindukált CD változás

Megvizsgáltuk, hogyan hat az antimycin A és a hozzá hasonló hatású myxothiazol a kloroplasztisz fényindukált CD változásaira. A gátlás során a fényindukált CD változás amplitúdója csökkent, a kinetika lényegében változatlan maradt, ahogy ez a 15. ábrán látható antimycin A jelenlétében.



15. ábra A kloroplasztisz fényindukált CD változása 510 nm-en mérve, 0, 7, 15  $\mu\text{M}$  antimycin A jelenlétében. A mérést 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A nyilak a megvilágító fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása  $500 \text{ W/m}^2$  volt.

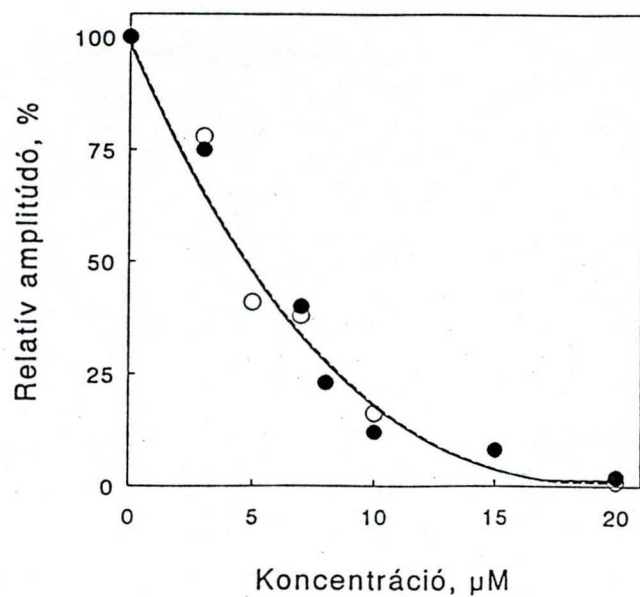
A 16. ábrán azt is láthatjuk, hogy a kloroplasztisz CD spektruma antimycin A jelenlétében is változatlan marad. Vagyis, a gátlószerek jelenléte a makrodomén organizációt nem befolyásolja (ez a psi-típusú CD jel meglétéből látható), ugyanakkor viszont a makrodomének struktúraváltozása gátolható ezekkel a szerekkel.



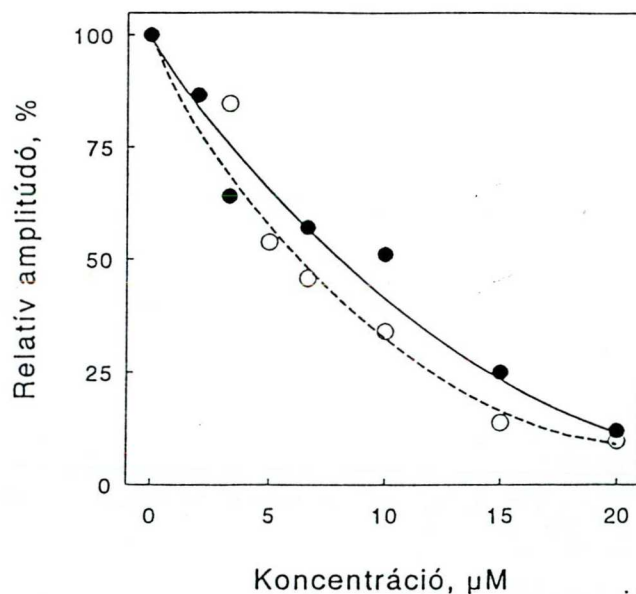
16. ábra A kloroplasztisz CD spektruma kontroll (antimycin A-t nem tartalmazó minta) (1) és 15  $\mu\text{M}$  antimycin A jelenlétében (2). A mérést 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt.

A 17. ábrán mutatom be az antimycin A és myxothiazol hatására létrejött fényindukált CD változás koncentráció függését ( $I_{50} = 4\text{-}5 \mu\text{M}$ ).

Elvégeztük az előbbi kísérleteket 5  $\mu\text{M}$  DCMU, 150  $\mu\text{M}$  PMS és 1 mM Na-aszkorbát jelenlétében. Ilyen kísérleti körülmények között a PSII gátolva van és csak a PSI körüli ciklikus elektrontranszport működik. A 18. ábrán látható, hogy a gátlás mértéke hasonló volt, mint a teljes elektrontranszportlánc esetén. (A myxothiazol jelenlétében a gátlás megegyező volt az antimycin A-val történt gátlással, ezért az ábrán ezt külön nem tüntettem fel.)



17. ábra A fényindukált CD változás amplitúdója az antimycin A (●) és a myxothiazol (○) koncentrációjának függvényében. A mérést intakt kloroplastiszon, 20 mM tricin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $\text{W/m}^2$  volt.



18. ábra A fényindukált CD változás amplitúdója az antimycin A koncentrációjának függvényében, tilakoid membrán esetében (○) és 5  $\mu\text{M}$  DCMU, 150  $\mu\text{M}$  PMS és 1 mM Na-aszkorbát jelenlétében, intakt kloroplastiszon mérve (●). A mérést 20 mM tricin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $\text{W/m}^2$  volt.

Ebből a kísérletből egyértelműen kiderül, hogy a PSII működésének hiánya vagy jelenléte nem befolyásolja a gátlás mértékét. Ugyanígy, izolált tilakoid membrán esetében teljesen hasonló eredményt kaptunk (18. ábra).

#### 5.6.1.2. Fényindukált fényezés változás

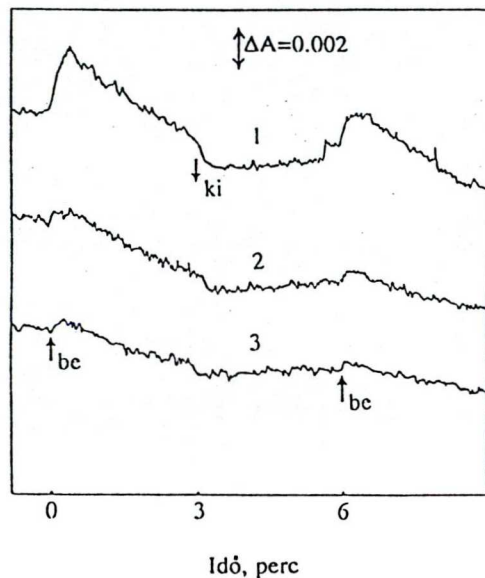
Horton és mtsi (1991) vizsgálták az antimycin A hatását a fényindukált fényezés változásra. Azt találták, hogy az antimycin A-ra érzékeny fényezésnek igen specifikus spektrális karakterisztikája van, 535-540 nm körüli maximummal, amely a tilakoid membránban végbemenő szignifikáns konformációváltozásra utal. A gátlás kinetikája hasonló a  $q_E$  gátlásához.

Elméleti tanulmányok azt sugallják (Duniec és Thorne, 1977), hogy ebben a hullámhossztartományban lévő fényezés változás a membrán komponensekből kialakult nagy domének konformációváltozásához köthető. Ez jól egyezik a CD-ből ill. a fényindukált CD változásból levont következtetésekkel (Garab és mtsi, 1988a,b). A domének mérete 200-400 nm-re becsülhető (Garab és mtsi, 1988c; Finzi és mtsi, 1989).

Megvizsgáltuk a fényezés változás nagyságát antimycin A és myxothiazol jelenlétében a fényindukált CD változásnál általánosan használt kísérleti körülmények között.

Kísérletünk során mindkét gátlószer gátolta a fényindukált fényezés változást, kb. 20  $\mu\text{M}$ -nal értünk el telítést (19 ábra). Horton és mtsi kisebb koncentrációnál kaptak

gátlást, ennek valószínű oka a két kísérletben használt médium  $Mg^{2+}$  ion mennyiségének különbsége volt (P. Horton, személyes közlés).



19. ábra A  $\Delta A_{505-545}$  nm-nél mért fényszórás változás, intakt kloroplasztiszokon, kontroll, inhibitort nem tartalmazó minta (1), 20  $\mu M$  antimycin A (2) és 20  $\mu M$  myxothiazol (3) jelenlétében. A nyilak a gerjesztő fény be- és kikapcsolását jelzik.

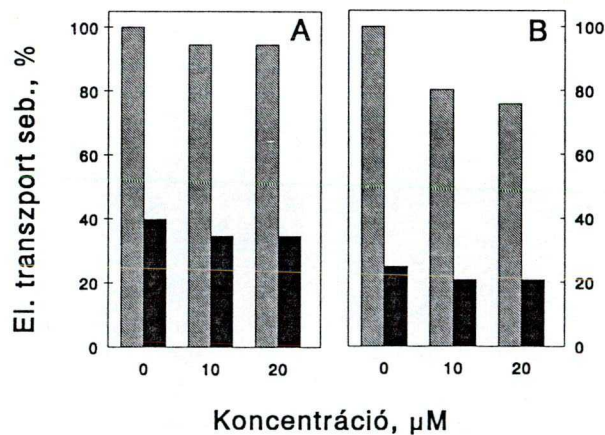
Ez a kísérlet a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Garab és mtsi, 1988a) megerősíti a fényszórás változás és a szerkezetváltozás összefüggését. A kinetikai eltéréseken túl a két mérőmódszer specifikussága közötti különbségnek tudható be, hogy míg a fényszórás változás nem gátolható teljesen az előbbi inhibitorokkal, a  $\Delta CD$ -nél 100 %-os gátlást kapunk.

Mind az antimycin A mind pedig a myxothiazol gátolja a fotoszintetikus baktériumokban és a mitokondriumban a légzési láncot a citokróm b/c komplex kinon kötőhelyein (Thierbach és Reinbach, 1981). Ez azonban nem magyarázza meg a tilakoid

membránok fényindukált struktúraváltozására gyakorolt gátló hatásukat. Ezért szükséges volt megvizsgálnunk, milyen más hatásuk van a kloroplasztisban, amely megmagyarázná hatásukat a fotokémiai reakcióúttal összefüggő folyamatokra.

### 5.6.1.3. A lineáris elektrontranszport

Mint a 20. ábra mutatja, az elektrontranszport lánc érzéketlen antimycin A-ra és myxothiazolra, mind szétkapcsoló (uncoupler) hiányában mind annak jelenlétében. Tehát ezek a gátlószerek, nem gátolják az elektrontranszportot és szétkapcsoló hatásuk sincs.



20. ábra Az elektrontranszportlánc gátlása antimycin A-val (A) és myxothiazollal (B). A lineáris elektrontranszport sebességét Hill-reakció alapján, víztől ferricianidig, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl jelenlétében (■) és hiányában (■) mértük.

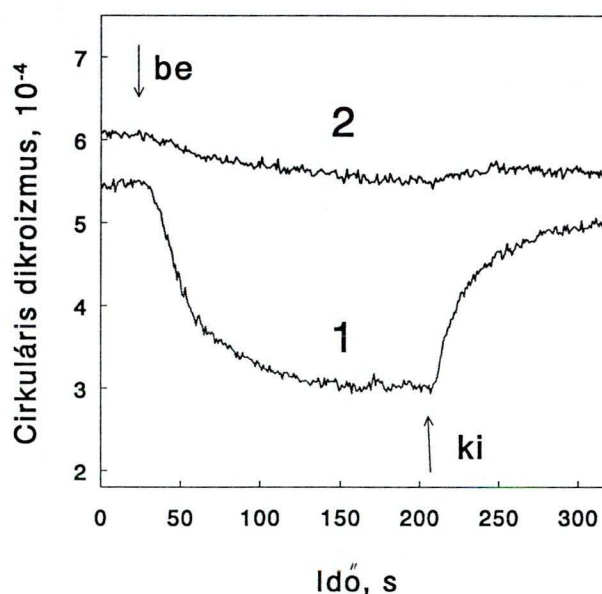
#### 5.6.1.4. Klororespiráció

Ravenel és Peltier (1991) kimutatták, hogy zöld algákon az antimycin A és myxothiazol gátolja az oxigén felvételt ( $I_{50} = 2 \text{ mM}$ ), kb. egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban, mint a mitokondriális légzést. Feltételezték, hogy e két vegyület a klororespiráció (a kloroplasztisz légzési funkcióját) gátolja. A klororespiráció a citokróm  $b_6/f$  komplexen ágazik el az elektrontranszporttól (Bennoun, 1982; Garab és mtsi, 1989). Így a gátlás helye a citokróm  $b_6/f$  komplex lehetne, amely a bakteriális citokróm  $b/c$  komplexszel való hasonlósága miatt könnyen megmagyarázná e vegyületek tulajdonságait.

Azonban klororespiráció nem mutatható ki izolált tilakoid membránon és különösen nem PMS és DCMU jelenlétében. A fényindukált CD változást tehát olyan körülmények között is gátolják ezek az inhibitorok, amelyek között a klororespirációra gyakorolt hatásuk kizárható. Továbbá villanófény-indukált abszorpciós tranziensek segítségével azt is kimutatták, hogy sem az antimycin A sem a myxothiazol nem befolyásolja a citokróm  $b_6/f$  fényindukált redox tranzienseit - szemben a klororespiráció jól ismert gátlószereivel (Garab és mtsi, 1989). Ezen adatok alapján ezért megállapítható, hogy az antimycin A és a myxothiazol nem a klororespiráción keresztül gátolják a struktúraváltozást.

### 5.6.1.5. Detergens hatás

Sokféle elképzelés született az antimycin A hatásmechanizmusáról. Mivel ez a vegyület a tapasztalatok szerint több folyamatra van hatással, Horton és Ruban (1992) a gátlást membránra való általános hatásként magyarázták. Ezen elképzelés szerint az antimycin A detergensként működhet, így nyilván a makroaggregációt is gátolhatja.



21. ábra A kloroplasztisz fényindukált CD változása kontroll (1) és 40  $\mu\text{M}$  Triton X-100 hozzáadása mellett (2). A mérést 20 mM tricin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A nyilak a megvilágító fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása 500  $\text{W/m}^2$  volt.

Ezért összehasonlítást végeztünk egy jól ismert detergennel, a Triton X-100-zal. A feltételezéssel összhangban azt találtuk, hogy ez a detergens ugyanúgy gátolja a fényindukált CD változást, mint az antimycin A és a myxothiazol (21. ábra). Az



összehasonlító kísérletekből azonban az is kiderült, hogy az Triton X-100 az antimycin A-val és myxothiazollal ellentétben gátolja a lineáris elektrontranszportot is (1. táblázat). Ez az eredmény arra utal, hogy az antimycin A és a myxothiazol hatása nem értelmezhető, mint detergens hatás.

*1. táblázat Az antimycin A és a Triton X-100 hatása a lineáris elektrontranszport láncrea, víztől ferricianidig mérve. Mindhárom mérésnél a kezeletlen minta megfelelő paramétere szolgált referenciaként (100 %).*

	Elektrontranszport sebessége, %	CD amplitúdója, %	$\Delta$ CD amplitúdója, %
20 $\mu$ M Antimycin A	100	105	0
20 $\mu$ M Triton X-100	61	100	31
40 $\mu$ M Triton X-100	38	87	0

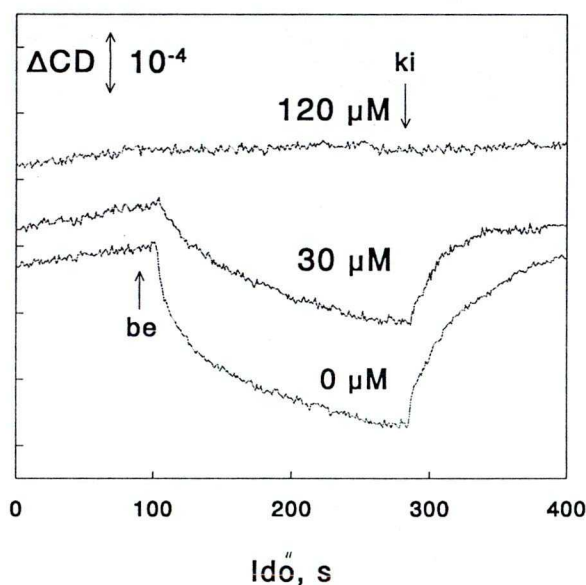
#### 5.6.2. Más kinon antagonistá vegyületek hatása

Bár az antimycin A és a myxothiazol szerkezete egymástól különböző, közös vonásuk, hogy mindkettő kinon antagonistá vegyület. Ezért megvizsgáltunk más kinon-antagonistá vegyületeket is. A DBMIB (22. ábra) és HQNO magas koncentrációban ( $I_{50}=50 \mu\text{M}$ ) az antimycin-A-hoz és myxothiazolhoz hasonlóan gátolják a fényindukált CD változást.

Mivel ismert, hogy ezek a vegyületek gátolják a citokróm  $b_6/f$  reakcióit (Trebst, 1980) és magas koncentrációban a PSII-t (Izawa, 1979; Droppa és mtsi, 1981), ezért

ezeket a kísérleteket az előzőekben leírt mennyiségű DCMU, PMS és Na-aszkorbát jelenlétében végeztük, ezzel kiküszöbölve ezeket a hatásokat.

A leírt adatok alapján feltételezhető, hogy a makrodomének szerkezetváltozásának gátlása ezen vegyületekkel azon alapul, hogy az LHCII-n létezik egy kis affinitású kinon kötőhely, amelyhez kötődve a kinon antagonistá vegyületek gátolják a makrodomének szerkezeti átrendeződéseit.



22. ábra A DBMIB hatása a fényindukált CD változásra, 5  $\mu\text{M}$  DCMU, 150  $\mu\text{M}$  PMS és 1 mM Na-aszkorbát jelenlétében; kontroll (0  $\mu\text{M}$ ), 30  $\mu\text{M}$  és 120  $\mu\text{M}$  DBMIB hozzáadásával. A mérést intakt kloroplasztiszon 20 mM tricín (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A nyilak a megvilágító fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása 500  $\text{W/m}^2$  volt.

### 5.7. A kationok hatása

Korábbi CD spektroszkópiai vizsgálatok megmutatták, hogy a makrodomén aggregáció függ a közeg  $Mg^{2+}$  ion tartalmától, az ozmotikus nyomástól és a membrán LHCII tartalmától. Az ozmotikus nyomás a membránon belüli összetartó erőt - packing, míg a  $Mg^{2+}$  ion membránok közötti stacking kölcsönhatás erősségét határozza meg (Garab és mtsi, 1991). A  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának növelésével nő a CD spektrum amplitúdója, amely a nagyobb méretű domének kialakulásának következménye (Barzda és mtsi, 1994). A makrodomén szerveződés szempontjából tehát fontos szerepe van a membránokat összetartó kationoknak. Az eddigiek során a CD spektrum psi-típusú sávjai intenzitásának ionerősség függését részletesen csak  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében mérték (Garab és mtsi, 1991).

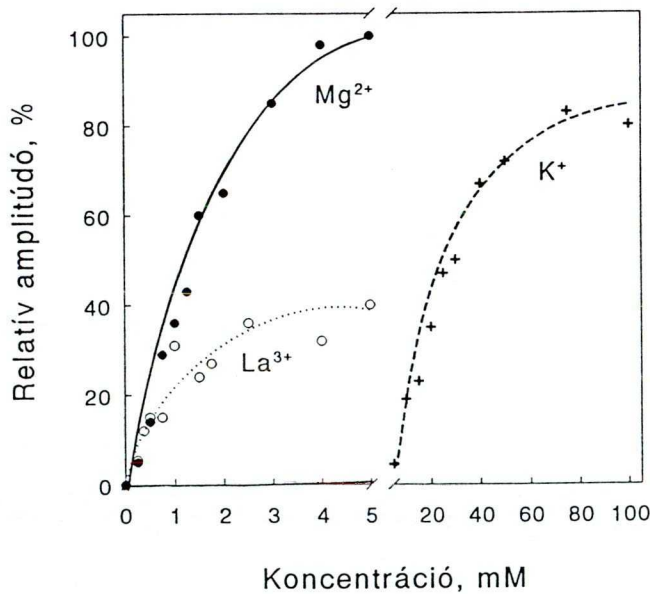
Munkám során megvizsgáltam, hogyan függ a psi-típusú CD amplitúdója és ennek fényindukált reverzibilis változása a különböző kationok koncentrációjától és hogyan változik a makrodomén szerveződés kialakulásához szükséges ionkoncentráció a pozitív töltések számának növekedésével.

A 23. ábrán három különböző vegyértékű kation hatását láthatjuk a reverzibilis fényindukált CD változásra. Látható, hogy a kétértékű  $Mg^{2+}$  ion jóval kisebb koncentrációjánál kialakul a fényindukált CD változás, mint az egy vegyértékű  $K^+$  esetén. (Ez más kétértékű ionok (pl.  $Ca^{2+}$ ) is igaz.)

Ezek alapján azt vártuk, hogy a fényindukált CD változás létrehozásához a három vegyértékű ionok még kisebb koncentrációja elegendő. Azonban az általunk használt  $La^{3+}$  ion jelenlétében a fényindukált CD változás amplitúdója kisebb volt, mint

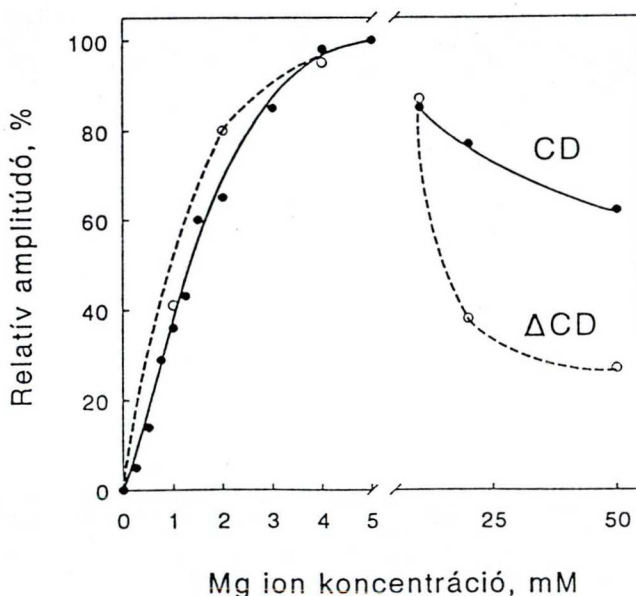
$Mg^{2+}$  vagy  $K^+$  ion jelenlétében. Ez minden valószínűség szerint azzal magyarázható, hogy a  $La^{3+}$  szorosán kötődik a membránfelszínhez. A  $La^{3+}$  ion koncentrációjának növelésével szabad szemmel látható aggregátumok jönnek létre, amelyek 1-2 perc alatt kiülednek a kűvetta aljára, így már nem mérhetők. Ezért ez az ion nem alkalmas a három vegyértékű ionok hatásának modellezésére.

Mindazonáltal ezek az eredmények jól összevethetők a korábban membrán stacking vizsgálataik során Barber és Chow (1979) és Chow és mtsi (1980) kation-koncentráció függés eredményeivel. Megállapíthatjuk tehát, hogy a királis makrodomének kialakulásához hasonlóan (ill. az azzal összefüggő stackinghez hasonlóan) a domének szerkezetváltozásai is függenek a közeg ionerősségétől.



23. ábra A fényindukált CD változás nagysága az ionok koncentrációjának függvényében. A mérést intakt kloroplastiszon 20 mM tricin (pH 7,7), 0,35 M szorbit tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$  volt. A megvilágító fény intenzitása  $500 \text{ W/m}^2$  volt.

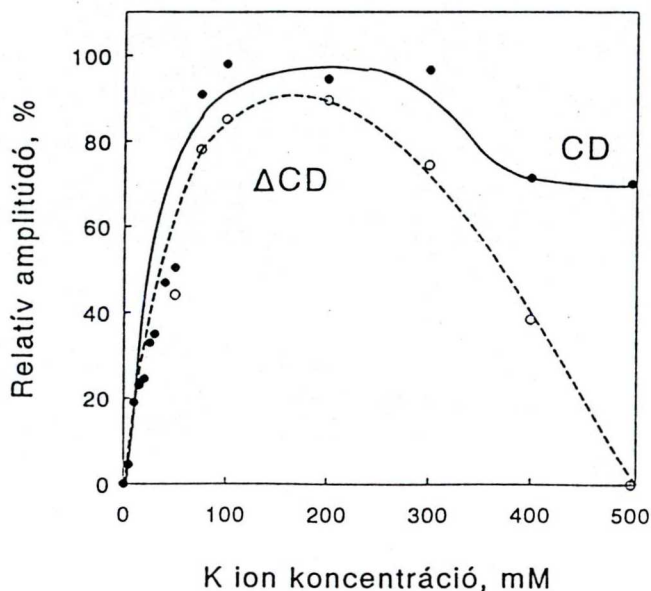
A stacking maximális értékét elérve, az ionkoncentráció további növelésével már nem változik. Ezzel ellentétben - ezt mutatják a következő ábrák (24., 25. ábra) - a fényindukált CD változás mértéke csökken az ionkoncentráció növekedésével. Ennek az lehet az oka, hogy a túl nagy koncentrációban adott kationok már olyan erős kötést létesítenek a membránok között, ami meggátolja a struktúraváltozást.



24. ábra A CD spektrum psi-típusú vörös sávjainak össz-amplitúdója (CD) és a fényindukált CD változás nagysága ( $\Delta CD$ ) a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának függvényében. A mérést intakt kloroplasztiszon 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu g/ml$  volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $W/m^2$  volt. Az össz-amplitúdót a (-)647 nm-es és (+)688 nm-es sáv abszolút érték amplitúdó összegeként definiáltuk.

A kationok koncentrációjának növelésével a psi-típusú CD sávok amplitúdója is csökken. Elképzelhető, hogy a CD technika érzéketlenné válik túlságosan nagy

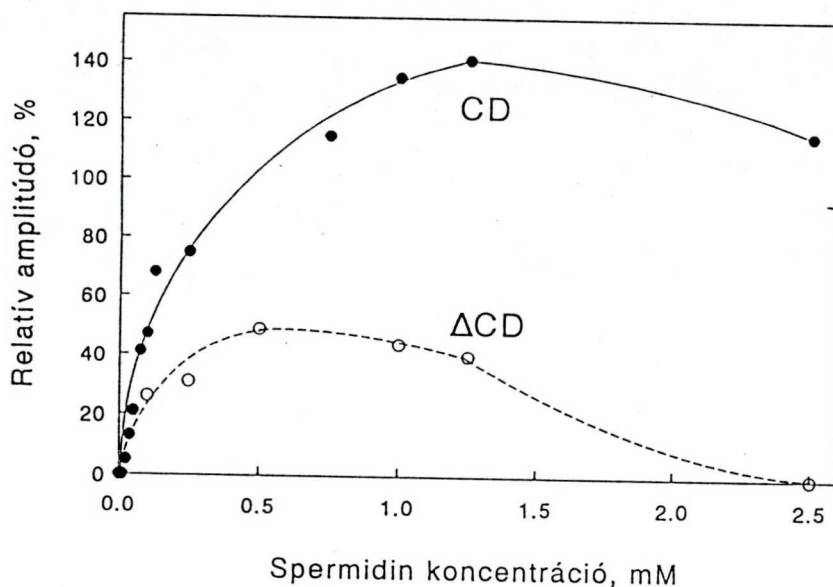
aggregátumok kimutatására, vagy a kationok - főleg magasabb koncentrációban - a királis paramétereket is változtatják.



25. ábra A CD spektrum psi-típusú vörös sávjainak össz-amplitúdója (CD) és a fényindukált CD változás nagysága ( $\Delta$ CD) a  $K^+$  ion koncentrációjának függvényében. 100%-nak az 5 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében ugyanezen hullámhosszon mért CD jel amplitúdója ill. fényindukált CD változás nagysága tekintendő. A mérést intakt kloroplasztiszon 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu$ g/ml volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $W/m^2$  volt. Az össz-amplitúdót a (-)647 nm-es és (+)688 nm-es sáv abszolút érték amplitúdó összegeként definiáltuk.

Kotzabasis és mtsi (1993) vizsgálták a különböző poliaminok mennyiségét a kloroplasztiszokban és az ezt felépítő részecskéikben. Eredményeik azt mutatják, hogy a PSII 1-2 nmol/mg kl koncentrációban tartalmaz spermidint (triamin) és spermint (tetraamin). Feltételezések szerint ezek a membránlipidekkel való kölcsönhatásukon keresztül stabilizálják a membrán szerkezetét (Popovic és mtsi, 1979; Roberts és mtsi,

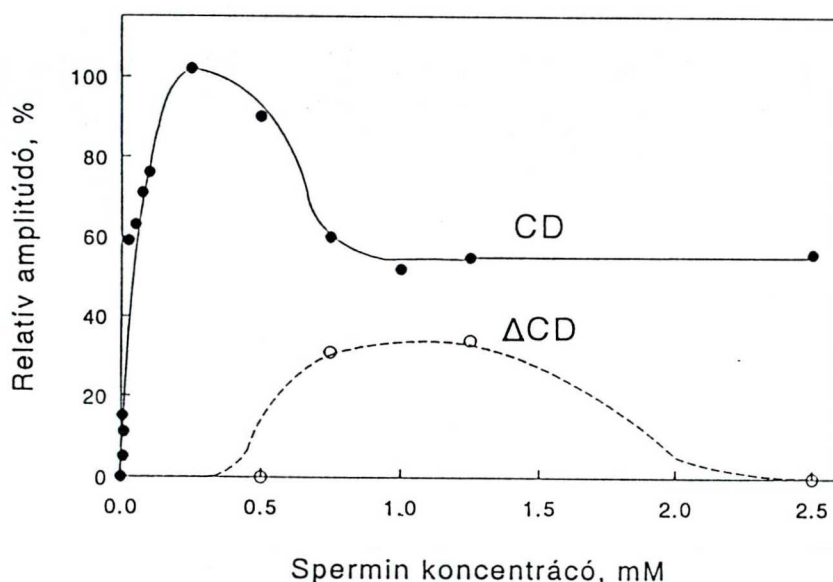
1986). Bár a poliaminok szerepe a kloroplasztiszon belül nem tisztázott és azt sem tudjuk, hogy kötött vagy szabad ionos formában vannak-e jelen, méréseink során, mint több pozitív töltést hordozó kationokat használtuk.



26. ábra A CD spektrum psi-típusú vörös sávjainak össz-amplitúdója (CD) és a fényindukált CD változás nagysága ( $\Delta$ CD) a spermidin koncentrációjának függvényében. 100%-nak az 5 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében ugyanezen hullámhosszon mért CD jel amplitúdója ill. fényindukált CD változás nagysága tekintendő. A mérést intakt kloroplasztiszon 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu$ g/ml volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $W/m^2$  volt. Az össz-amplitúdót a (-)647 nm-es és (+)688 nm-es sáv abszolút érték amplitúdó összegeként definiáltuk.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk (26., 27. ábra), hogy bár e vegyületek jelenlétében is hasonló nagyságú CD jel alakul ki, mint a  $Mg^{2+}$  ionnal (ill. a spermidin esetén még kicsit nagyobb is), és ehhez kisebb koncentrációra van szükség, ugyanakkor

viszont a kialakult fényindukált CD változás sokkal kisebb, mint  $Mg^{2+}$  ion használata esetén. A koncentráció további növelésével a fényindukált CD változás és a psi-típusú CD spektrum is csökken, bár kisebb mértékben, mint a fényindukált CD változás (26., 27. ábra).



27. ábra A CD spektrum psi-típusú vörös sávjainak össz-amplitúdója (CD) és a fényindukált CD változás nagysága ( $\Delta$ CD) a spermin koncentrációjának függvényében. 100%-nak az 5 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében ugyanezen hullámhosszon mért CD jel amplitúdója ill. fényindukált CD változás nagysága tekintendő. A mérést intakt kloroplasztiszon 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu$ g/ml volt. A megvilágító fény intenzitása 500 W/m<sup>2</sup> volt. Az össz-amplitúdót a (-)647 nm-es és (+)688 nm-es sáv abszolút érték amplitúdó összegeként definiáltuk.



A  $Mg^{2+}$  iontól való eltérésnek az lehet az oka, hogy a spermin és spermidin erősebb kötést alakít ki a membránnal, amely lehet, hogy éppen a kloroplasztiszon belüli szerepüknek tulajdonítható.

A 2. táblázat néhány ion hatását mutatja a fényindukált CD változásra. Az is látható, hogy a fényindukált CD változással ellentétben, a fotoszintetikus elektrontranszport sebessége a várakozásnak megfelelően sokkal kevésbé függ az ionkoncentrációtól.

*2. táblázat Különböző ionok hatása a fényindukált CD változásra és az elektrontranszport sebességére. A fényindukált CD változást ( $\Delta CD$ ) a 24-27. ábrán bemutatottakkal azonos körülmények között mértük. Az elektrontranszport sebességét víztől ferricianidig spektrofotometriásan határoztuk meg.*

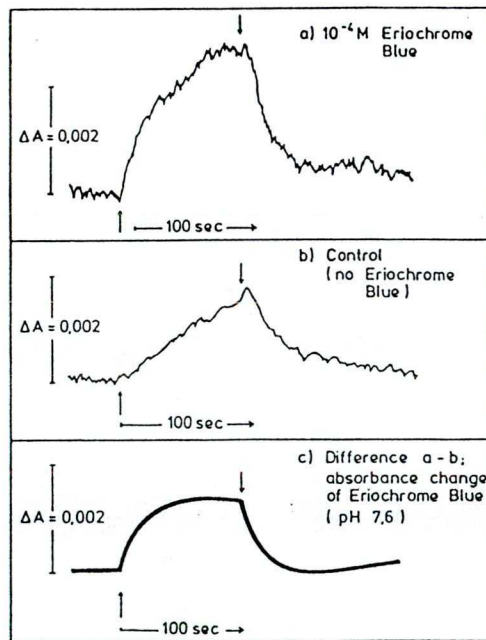
Koncentráció mM	Elektron transzport sebesség, % $Mg^{2+}$	$\Delta CD$ változás, $\Delta A \cdot 10^{-4}$		
		$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	$K^+$
0,25	100	0,28	0	0
1	95	0,54	0,82	0
5	80	1,57	1,62	0
50	-	0,44	0,45	0,99

### 5.8. $Mg^{2+}$ ion felszabadulása

A fény hatására, az intakt kloroplasztiszon létrejött protontranszportot másodlagos ionmozgás követi, amely révén a membrán két oldala közötti töltés kiegyenlítődik. A töltéskiegyenlítés leginkább a  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$  és kisebb mértékben a  $K^+$

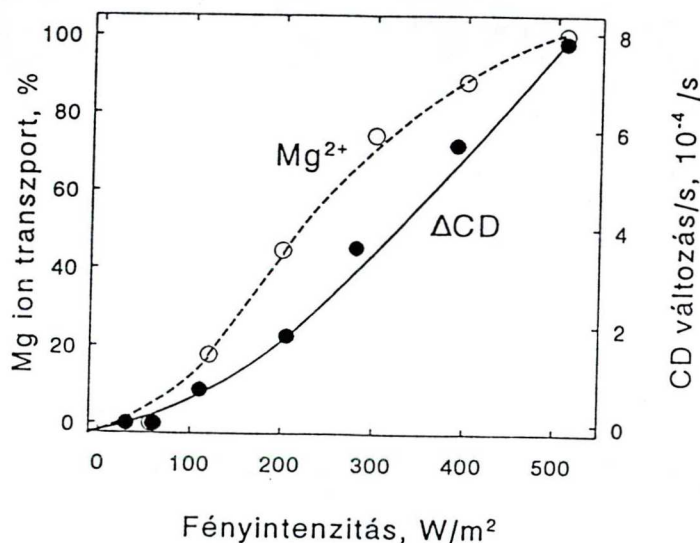
ionok mozgásából adódik (Hind és mtsi, 1974). Az iontranszport során a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációja nő a sztróma régióban, amely a feltételezések szerint elősegíti a membrán stacking-et, a fotofoszfórilációt és a két fotoszisztéma közötti energia eloszlást (Barber, 1976). Mivel a  $Mg^{2+}$  ionnak fontos szerepe van a makrodomének struktúrájának kialakításában, felmerül a kérdés, hogy összefügg-e a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulása a fényindukált CD változással.

A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulását az Eriochrome Blue SE-t tartalmazó és nem tartalmazó mintán mért abszorpcióváltozás különbségeként számítottuk, ahogy ezt a 28. ábra mutatja. Krause (1977) méréseihez hasonlóan, 554 nm-en Eriochrome Blue SE indikátor hozzáadása nélkül is kapunk abszorpcióváltozást, amely a fényindukált fényszórásváltozásból származik.



28. ábra A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulásának mérése. Az ábra az 554 nm-en létrejött abszorpcióváltozást mutatja az Eriochrome Blue SE indikátor jelenlétében (a) és hiányában (b) ill. a kapott két jel különbsége, amely a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának valós változása (c) (Krause, 1977).

Először összehasonlítottuk a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulását és a fényindukált CD változás fényintenzitás függését, ahogy ez a 29. ábrán látható. Ezek hasonlósága a két folyamat kapcsolatára utal. A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulásának fényintenzitás függését nem lehet egy egyszerű - a membrán két oldala közötti töltés kiegyenlítésével magyarázni, mivel ilyen esetben telítési görbét kellene kapnunk. (A  $\Delta pH$  és az elektrontranszport kb.  $100 \text{ W/m}^2$  fényintenzitásnál telítődik.)



29. ábra A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulása ( $Mg^{2+}$ ) és a fényindukált CD változás kezdősebessége ( $\Delta CD$ ) a megvilágító fény intenzitásának függvényében.

Az Eriochrome Blue indikátorról ismert (Krause, 1977), hogy csak a szabad  $Mg^{2+}$  ion tartalomra érzékeny, így csak a kloroplasztiszban lévő szabad  $Mg^{2+}$  ion koncentrációját mérhetjük. Ha a mintánkhoz túl nagy mennyiségű  $Mg^{2+}$  iont adunk, az indikátor Mg-kötött formájának koncentrációja megnő. Mivel a keletkezett komplex

sötétlila, nagy mennyisége zavarja a spektroszkópiai mérést. Ezért ezeket a kísérleteket 0,1-1 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében végeztük.

A korábbiakban láttuk, hogy a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának növelése növeli a fényindukált CD változást. Felmerül a kérdés, változtatja-e és hogyan a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának növelése a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulását. Összehasonlítva az 1 mM  $Mg^{2+}$  iont tartalmazó mintában a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulása 30 %-kal növekszik meg a kontrolhoz képest. Ugyanakkor a fényindukált CD változás 45 %-os 1 mM  $MgCl_2$  jelenlétében ( az 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú minta maximális fényindukált CD változásához képest). Tehát a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának növelése hasonlóan megnöveli a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulását, mint ahogy a struktúraváltozást (3. táblázat).

*3. táblázat A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulása ( $\Delta A$ ) és a fényindukált CD változás amplitúdója ( $\Delta CD$ ) a táblázatban feltüntetett körülmények között. A kontrol a hozzáadott  $Mg^{2+}$  iont nem tartalmazó minta.*

	$\Delta A, 10^{-3}$	$\Delta CD^*, \%$
Kontrol	7.66	0
+ 1 mM $Mg^{2+}$	9.92	45
++ 10 $\mu M$ Ca-ionofór	6.02	20

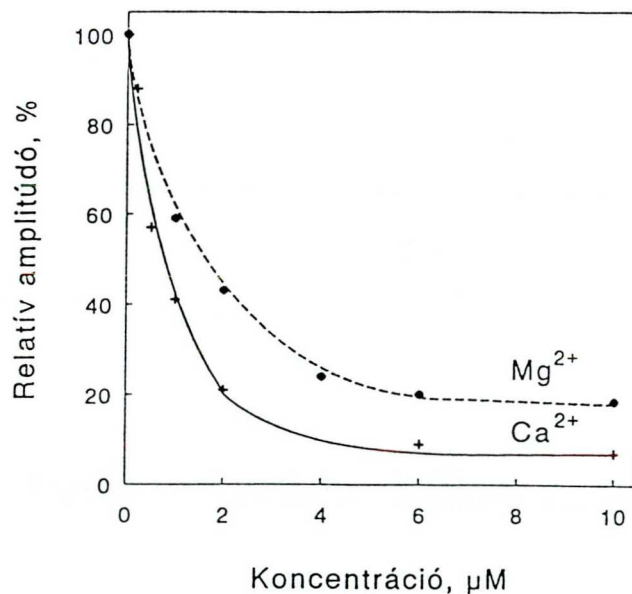
*\*100 % az 5 mM  $Mg^{2+}$  tartalmú minta fényindukált CD változás amplitúdója*

### **5.9. Az A23187 ionofór hatása**

Webber és Gray (1989) radioaktív  $Ca^{2+}$  ion használatával kimutatták, hogy a minor antenna komplexeken lévő DCCD kötőhely egyben  $Ca^{2+}$  ion kötőhely is. Horton és Ruban (1992) úgy találták, hogy a  $q_E$  gátolható Ca-ionofórral.

Láttuk, hogy a  $Mg^{2+}$  ion transzportja összefügg a fényindukált struktúraváltozással. A  $Mg^{2+}$  ionról kimutatták, hogy a legfontosabb ion, amely a  $H^+$  ionnal ellentétesen mozog a tilakoid membránon keresztül (a belső térből a sztrómába) megvilágítás hatására (lásd 5.8. fejezet).

Korábban kimutatták, hogy az A23187 ionofórnak szétkapcsoló hatása van a  $Mg^{2+}/H^+$  ion transzportra, tehát kiegyenlíti a  $Mg^{2+}$  ion koncentrációját a membrán két oldala között. Az A23187 ionofór kis koncentrációban szelektív a kétértékű ionokra, magasabb koncentrációban ( $> 10 \mu M$ ) képes egyértékű kationok szállítására is. (Reed és Lardy, 1972; Ben-Hayyin és Krause, 1980). A 30. ábrán 5 mM  $Ca^{2+}$  ion és 5 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében kapott fényindukált CD változás gátlása látható az ionofór koncentrációjának függvényében.



30. ábra A fényindukált CD változás amplitúdójának nagysága 5 mM  $Ca^{2+}$  és 5 mM  $Mg^{2+}$  ion jelenlétében, az A23187 ionofór koncentrációjának függvényében. A mérést intakt kloroplasztison 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM  $MgCl_2/CaCl_2$  tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20  $\mu g/ml$  volt. A megvilágító fény intenzitása 500  $W/m^2$  volt.

Megvizsgáltuk, befolyásolja-e az A23187 ionofór a  $Mg^{2+}$  ion membránon keresztüli transzportját. A 3. táblázatból leolvasható, hogy hasonlóan a fényindukált CD változás gátlásához, a  $Mg^{2+}$  ion transzportja is gátlódik az A23187 ionofór jelenlétében.

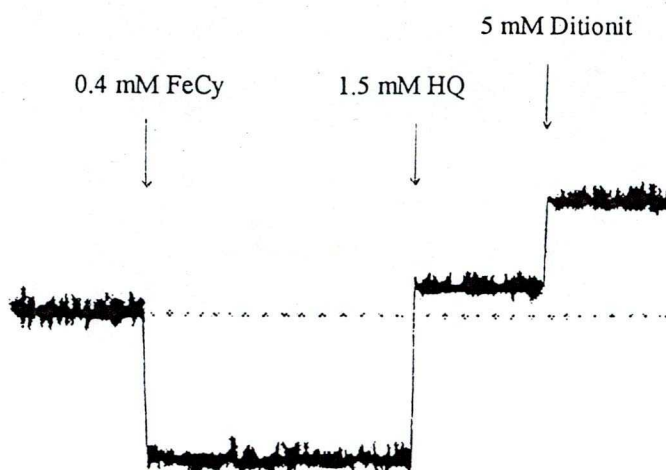
### ***5.10. Az antenna struktúraváltozása és a kloroplasztiszban lejátszódó más folyamatok kapcsolata***

#### ***5.10.1. A citokróm $b_{559}$***

A citokróm  $b_{559}$  szerepe a fotoszintézisben nem ismert. A kloroplasztiszban a PSII-höz kötötten, két különböző redoxpotenciálú formában van jelen (HP és LP). Egyes feltételezések szerint szerepet játszhat a reakciókomplex stabilizálásában (Arnon és Tang, 1988; Ortega és mtsi, 1989). Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a különböző formák egymásba alakulásában szerepet játszhat a PSII és az antenna proteinek protonáltsága.

Megvizsgáltuk, változik-e a citokróm  $b_{559}$  HP és LP formájának aránya vagy a HP forma redox állapota a makrodomének kialakulásának függvényében. Mérésünk során vizsgáltuk a HP és LP forma arányát egy csak triclin (pH. 7,7) pufferban szuszpendált (nincs makroaggregáció) és a triclin (pH 7,7) mellett 0,35 M szorbit és 5 mM  $MgCl_2$  tartalmú közegben (makrodomének jelenlétében) szuszpendált tilakoid minta között. A mérés során először a citokróm  $b_{559}$ -t oxidáltuk ferricianiddal, majd a HP formát redukáltuk hidrokinonnal, ezután ditionittal az LP formát. A kapott spektroszkópiai változásokat a 31. ábra mutatja. A számításokat az Anyagok és

módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük. A mérések szerint sem a citokróm b<sub>559</sub> HP és LP formájának koncentrációja sem a HP forma redox állapota nem függött a makrodomének jelenlététől (4. táblázat).



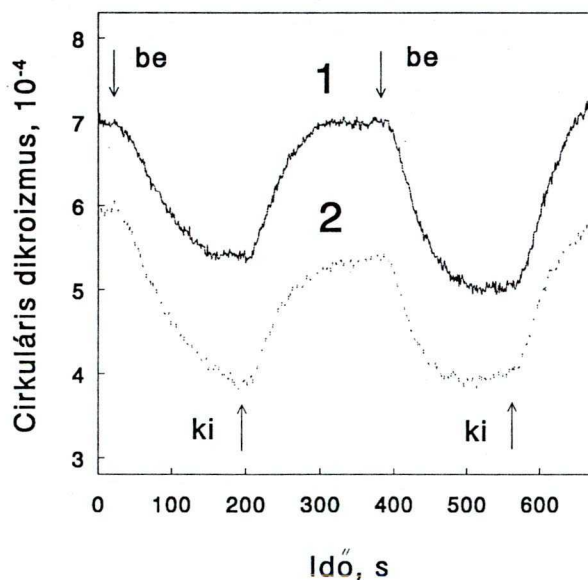
31. ábra Az ábrán feltüntetett reagensek hatására 559 nm-nél mért abszorpcióváltozás, kloroplasztisz esetében. A klorofill koncentrációja 77  $\mu\text{g/ml}$  volt. (FeCy - ferricianid, HQ - hidrokinon)

4. táblázat A citokróm b<sub>559</sub> változása. (A HP és LP forma koncentrációja  $10^{-5}$  mM-ban értendő).

	Cit. b <sub>559</sub> - HP	Cit. b <sub>559</sub> - LP	HP <sub>ox</sub> /HP <sub>red</sub>
Makrodomén hiányában	5.82	2.67	0.15
Makrodomén jelenlétében	5.69	2.69	0.17

### 5.10.2. Az LHCII foszforilációja

A fényviszonyok változására a növény a perifériális LHCII komplexek foszforilációjával és a PSII-ről való disszociációjával válaszol. Felmerül a kérdés, hogyan viszonyul egymáshoz a foszforiláció hatására lejátszódott disszociáció és a makrodomének struktúraváltozása, amelyet a fényindukált CD változással mérhetünk.



32. ábra A kloroplasztisz fényindukált CD változása 1 mM ATP és 10 mM NaF jelenlétében (1) és hiányában (2). A mérést 20 mM triclin (pH 7,7), 0,35 M szorbit és 5 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú közegben végeztük. A klorofill koncentráció 20 µg/ml volt. A nyilak a megvilágító fény be- és kikapcsolását jelzik, amelynek intenzitása 500 W/m<sup>2</sup> volt.

A kérdés az, hogy függ-e egymástól, vagy egymástól függetlenül játszódik-e le ez a két folyamat. A 32. ábra mutatja a fényindukált CD változást a kontrol (foszforiláció és defoszforiláció is lejátszódhat) és foszforilációs körülmények között, tehát amikor a



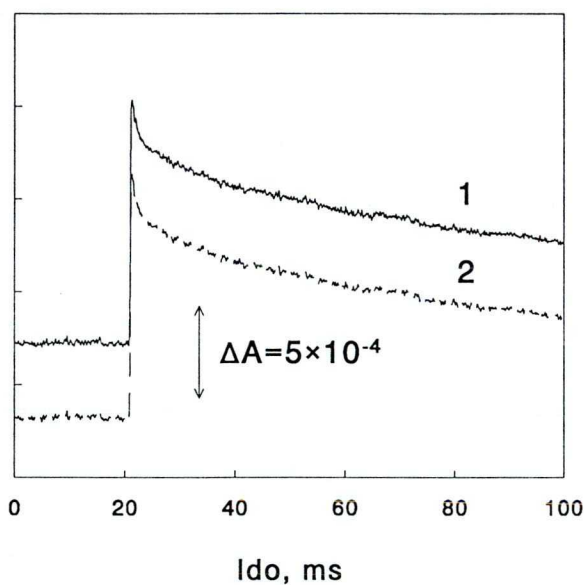
foszforiláció lejátszódhat, de a defoszforiláció gátolt (1 mM ATP és 10 mM NaF). Látható, hogy a fényindukált CD változás amplitúdója és kinetikája is lényegében megegyezik a két minta esetén. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az általunk vizsgált struktúraváltozás független a foszforilációtól.

### *5.10.3. A membrán permeabilitása*

A fényindukált töltésszétválasztás és az ezt követő töltésmozgások során felépül egy transzmembrán elektromos tér, amely  $10^5$  V/cm nagyságrendű. A töltésszétválasztás eredményeképpen a tilakoid membrán belső oldala pozitív, míg a sztróma felé eső oldal negatív töltésű lesz. A membránba ágyazott pigmentek abszorpciós sávjai eltolódnak az elektromos tér hatására, amely a pigmentek elektrokróm abszorpcióváltozásaként detektálható (Junge, 1977a). Ez technikai okok miatt, legkönnyebben 460 és 540 nm között mérhető; 515 nm-nél abszorpció növekedés míg 478 nm-nél abszorpció csökkenés detektálható.

Mivel a makrodomének membránba ágyazottak, a membrán szerkezetének megváltozása befolyásolhatja a membrán tulajdonságait. Megvizsgáltam a makrodomének struktúraváltozásának hatását a membrán két oldala között felépülő töltésszétválasztás lecsengésére. Ha a membrán permeabilitása megváltozik ez megmutatkozhat az előbb említett folyamat változásaként. Megmértem 515 nm-en a villanófény indukált tranziens változását, amellyel a membrán két oldala között felépülő töltésszétválasztás lecsengése mérhető. Nem találtam különbséget sem a 20 mM tricin (pH 7,7) és 0,35 M szorbit tartalmú közegben szuszpendált sem pedig az

előbbiek mellett 5 mM MgCl<sub>2</sub>-t tartalmazó minta között (33. ábra). Összehasonlítottam az 5 mM MgCl<sub>2</sub> tartalmú minta töltésszétválasztásának lecsengését sötétben és megvilágítás után is, amikor a minták aggregáltsága egymástól különbözik és itt sem találtam különbséget (ezt külön ábrán nem mutatom be). Ez utóbbi adatok azt mutatják, hogy a megvilágítás hatására bekövetkező szerkezetváltozások és az azt kísérő ionmozgások - várakozásainkkal ellentétben - lényegében nem befolyásolják a membrán permeabilitását.



33. ábra A villanófény indukált elektrokróm abszorpció változás kinetikája 515 nm-en mérve. 20 mM triclin (pH 7,7) tartalmú közegben (1) és 0,35 M szorbit és 5 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadása után (2). A klorofill koncentráció 10 µg/ml volt.

## 6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az antenneszerkezet szabályozási folyamatai igen fontos szerepet játszanak stressz hatások során vagy a növények különböző adaptációs folyamatában. Azonban igen keveset tudunk az ezzel összefüggő molekuláris mechanizmusról. Ezen belül is igen hiányosak ismereteink azokról a gyors struktúraváltozásokról (perces nagyságrendű vagy gyorsabb) amelyek - minden valószínűség szerint - szerepet játszanak a fotofizikai reakcióút szabályozásában.

Az energiaátadás hatékonyságát jelentős mértékben meghatározza a pigment rendszer szerkezeti felépítése. Ezek a paraméterek: a molekuláris dipólusok távolsága és egymáshoz viszonyított orientációjuk (Förster, 1965). Ugyanakkor minden valószínűség szerint szerkezeti és mikrokörnyezeti tényezők határozzák meg a fluoreszcencia hatásfokát ill. a sugárzás nélküli lecsengés (kioltás) valószínűségét is. A gerjesztési energia nem-fotokémiai kioltásának szabályozása igen gyors és reverzibilis folyamat. Erre leginkább a szerkezetváltozások lehetnek alkalmasak. A lassabb változásoknál már inkább szóba jöhetnek lassabb folyamatok, mint pl. komplexek szintézise vagy lebomlása, de ezek kívül esnek munkám keretein. Dolgozatomban a fotofizikai reakcióutak szabályozásával vélhetőleg kapcsolatban álló szerkezetváltozásokkal foglalkoztam.

Az antennarendszer ezen szerkezetváltozásának vizsgálatához a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia különösen alkalmas eszköz. Az exciton CD képes a komplexek belső szerkezetváltozását detektálni, míg a psi-típusú CD változással szerkezeti átrendeződések követhetők. E két típusú CD jel változása egymástól függetlenül vizsgálható, így megkülönböztethető a komplexek elrendeződésének ill.

belső szerkezetének változása. Tehát a CD spektroszkópia segítségével a tilakoid membrán királis makrodoméneinek különböző körülmények között bekövetkező struktúraváltozása jól követhető. Dolgozatomban e struktúraváltozás részletes karakterizálására törekedtem.

Mint ahogy ezt a dolgozatomban megmutattam és az alábbiakban részletesen diszkutálni fogom, a fényindukált CD változás korábbi értelmezése - a laboratóriumunkban elvégzett részletes vizsgálatok tükrében - kiegészítésre és jelentős korrekcióra szorul és a szerkezetváltozások értelmezésére egy eddig nem ismert mechanizmust kell feltételeznünk.

### ***6.1. A struktúraváltozás általános jellemzése***

A korábbi eredményekkel egyezően (lásd. 2.6. fejezet) azt találtuk, hogy a fényindukált CD változás csak makrodomének jelenlétében van. Ahogy a 4-6. ábrán látható, a PSII-képezte makroaggregátumok jelenlétében kapott psi-típusú CD jel különbözik a makrodoméneket nem tartalmazó (de egyébként változatlan összetételű) membránok CD jelétől. A fényindukált CD változás összekapcsolódik a fluoreszcencia hozam reverzibilis változásával, amely mivel a fotofizikai reakcióút változását jellemzi, a makrodomének struktúraváltozásának a fotofizikai reakcióút szabályozásában betöltött szerepére utalhat. Mivel a  $\Delta\text{pH}$  vagy általában a fotokémiai aktivitás közelítőleg azonos a két mintában, így ez nem lehet oka a kapott különbségnek.

Elmondhatjuk tehát, hogy fényindukált CD változás csak makrodomének jelenlétében figyelhető meg. Ezért a tilakoidokban fény hatására bekövetkező változás a

makrodomének struktúraváltozásának tulajdonítható. A psi-típusú CD spektrum és a fényindukált CD változás megfigyelhető mind kloroplasztiszban mind izolált LHCII esetén (Barzda és mtsi, 1996b). Ez első látásra kissé megnehezíti az in vivo kapott eredmények értelmezését (pl.  $\Delta\text{pH}$ , mivel izolált LHCII-ben nem alakul ki pH különbség). Ugyanakkor azt is világosan mutatja, hogy az a molekuláris mechanizmus, ami tilakoid membránban működik, működik a fotokémiai apparátus hiányában is. Ahogy ezt a későbbiekben, más kísérletekkel megerősítve megmutatom, valóban nem szükséges visszacsatolási mechanizmust feltételezni a fotokémiai és fotofizikai reakcióutak között.

Csoportunkban a kloroplasztisz és az izolált LHCII struktúraváltozásainak vizsgálata egymással párhuzamosan haladt. A továbbiakban az in vivo, izolált kloroplasztisz esetén kapott eredmények diszkussziójára törekszem, megjegyezve azt, hogy csoportunkban a mérések nagy részét izolált LHCII esetén is elvégezték hasonló eredménnyel.

A fényindukált struktúraváltozás nagysága függ a hőmérséklettől is (7, 9. ábra). A hőmérséklet növelésével nő a változás amplitúdója, majd 35-40 °C körül a fényindukált CD jel megszűnik (lényegében ugyanez tapasztalható izolált LHCII makroaggregátumokban is). A fényindukált CD változás 10 °C alatti hirtelen csökkenése a membrán rigiditásának növekedésével magyarázható (Calberg és mtsi, 1982).

Magas hőmérsékleten az LHCII és/vagy a minor antenna komplexek disszociálódhatnak a PSII „core” komplexről (Schreiber és Berry, 1977; Sundby és Anderson, 1985; Briantais és mtsi, 1996) ill. maga a PSII is inaktíválódik (Thomas és mtsi, 1986), amely a fényindukált CD változás megszűnését okozhatja.

Koleszterikus és nematikus folyadékkristályok fényindukált szerkezetváltozásainak (Jánossy, 1991) analógiájára, a termooptikai effektusra alapozva azt a hipotézist állítottuk fel (Barzda és mtsi, 1996b), hogy a beérkező fotonok hatására a makroaggregátumok egyes doméneiben lokális felmelegedések történnek és ezek okozzák a szerkezetváltozásokat. Ezzel a hipotézissel összhangban vannak azok az eredmények, amelyek megmutatták, hogy a psi-típusú aggregátumok (LHCII és tilakoid membrán) termikus stabilitása sokkal kisebb, mint a partikulumoké ill. az LHCII trimereké (Cseh Z., Simidjiev I. és Garab G., előkészületben).

Az elmondottak alapján feltételezhetjük, hogy a tilakoid makroaggregátumokban és az LHCII makroaggregátumokban is a fényindukált szerkezetváltozásokért valamilyen termikus effektus a felelős. A makrodoménekben fény hatására lokális felmelegedések történnek, amelyek hőmérséklete elérve a 35-40 °C-t, bekövetkezik a struktúraváltozás, amely sötétben lassan áll helyre. (A helyreállítás kinetikája hasonló ahhoz, amit folyadékkristályokban a hasonló mechanizmussal lejátszódó termooptikus hatás során megfigyeltek). Ha a külső hőmérséklet emelésével tartósan ezen a hőmérsékleten tartjuk a makroaggregátumokat, a rendszer elveszíti reverzibilitását (lényegében ugyanúgy, mint a hosszan tartó, erős külső megvilágítás hatására (Gussakovsky és mtsi, 1997)). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a psi-típusú CD spektrum magasabb hőmérsékleten is megfigyelhető, amely azt mutatja, hogy ekkor még maga a makrodomén létezik/kialakul, csak a szerkezetváltozásért vélhetőleg közvetlenül felelős, perifériális komplexek disszociálnak.

Simidjiev és mtsi (1997) legújabb vizsgálati eredményei szerint a lipidek is fontos szerepet játszanak a fényindukált CD változás kialakulásában. Ez arra utal, hogy a hosszabb idejű magas hőmérsékleten való inkubálás ill. hosszabb megvilágítás hatására a

lipid-fehérje asszociáció felbomlása is bekövetkezhet. A lipidek szerepének fontosságát a fotofizikai reakcióutak szabályozásában valószínűsítik Vasil'ev és mtsi (1997) eredményei is.

Tehát feltételezhető, hogy magas hőmérséklet hatására a perifériális antennakomplexek disszociálódhatnak a PSII „core” komplexről. Ugyanígy a rövidtávú adaptáció során szintén a perifériális antenna komplexek foszforilációja és disszociációja következik be. Felmerült a kérdés, hogy az antenna foszforilációja befolyásolja-e a struktúraváltozást.

Megvizsgáltuk a fényindukált CD változás kinetikáját és amplitúdóját foszforilációs körülmények között is (32. ábra). A kialakult változás nem különbözik jelentősen a kontrolltól. Ez úgy magyarázható, ha nem ugyanazon LHCI komplexek vesznek részt a foszforilációban és az általunk vizsgált struktúraváltozásban, vagy pedig a foszforiláció és az ezzel együttjáró disszociáció nem befolyásolja az antennakomplexek struktúraváltozását pl. a fényindukált CD változással detektált szerkezetváltozások megelőzik a foszforilációt. Ugyanakkor - mint azt csoportunkban kimutatták - a foszforiláció kismértékben befolyásolja a CD spektrumot. (Nosenko T., Liker E. és Garab G., előkészületben). Tehát a foszforiláció magát a makrodomén szerveződést változtatja meg kis mértékben, de nincs hatással a szerkezetváltozásokra. Ez jól magyarázható azzal a feltevéssel, hogy a foszforilációban és a szerkezetváltozásokban a perifériális antenna más-más részei vesznek részt. Ugyanakkor mivel a foszforiláció során csökken a perifériális antenna mérete, megváltozik a makrodomén aggregáció és ezzel együtt a CD jel amplitúdója is.

## 6.2. A fotoszintetikus reakcióút és a fényindukált struktúraváltozás összefüggése

Korábbi vizsgálatok alapján - amint azt a fentiekben részletesen ismertettem - úgy tűnt, hogy a makrodomének struktúraváltozását a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  szabályozza (Gregory, 1975; Faludi-Dániel és mtsi, 1984). Munkám során újabb, szisztematikus vizsgálatokat végeztem az összefüggés kérdésének tisztázására.

Az elektrontranszport sebességének, a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  kialakulásának és a fényindukált CD változás fényintenzitás függésének különbsége (10., 12. ábra) arra enged következtetni, hogy a lineáris elektrontranszport és a fényindukált CD változás nem kapcsolódik szorosan egymáshoz.

DCMU-val végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a fényindukált CD változás az elektrontranszport teljes gátlása mellett is végbemegy, bár az elektrontranszport hiányában sokkal lassabban alakul ki (11. ábra). Tehát megállapíthatjuk, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport alapvetően nem szükséges az LHCI makrodomének szerkezetváltozásához, azonban elősegíti létrejöttét.

A nigericin hatásának vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy a fényindukált CD változás gátlása nem követi szorosan a  $\Delta\text{pH}$  gátlását, ill. a  $\Delta\text{pH}$  teljes gátlása mellett is végbemehet a fényindukált struktúraváltozás (13. ábra). A magasabb koncentrációnál kapott gátlás vélhetőleg a másodlagos ionmozgásokkal és nem a  $\Delta\text{pH}$ -val kapcsolatos. Ugyanakkor a DCCD, amely közvetlenül az LHCI proteinek protonálódását gátolja, gátolja a struktúraváltozást is (14. ábra).

Renganathan és Dilley (1994) munkájuk során feltételezték, hogy az ATP képződésében fontos szerepet játszik egy a tilakoidban lokalizált proton-kötő domén,



amelyben több protein is részt vehet és ezek közül legfontosabb az LHCII. Kimutatták, hogy a lokalizált proton-kötő domének jelenléte az ATP kialakulás termodinamikai feltétele. Véleményünk szerint ugyanezen proton-domének játszanak szerepet az LHCII konformáció változásában is ill. a fény hatására létrejövő konformációváltozások elősegítésében is. Ezen proton-kötő domének kialakulása jelentős mértékben független lehet a lineáris elektrontranszport működésétől, de a lumen egészének savasodása ( $\Delta\text{pH}$ ) megkönnyítheti a lokális protondomének létrejöttét is.

Az LHCII szerepét a proton-kötő domének kialakulásában alátámasztja az LHCII aminosav szekvenciájának vizsgálata is, amelyet értékelve úgy tűnik, hogy számos régió van, amely képes protont megkötni (5 karboxil és 3 lizin/monomer) és más  $\text{H}^+$  kötő csoportok is elhelyezkednek a lumen oldalon (Karlin-Neumann és mtsi, 1985). Ezen proton kötő helyek gátolhatók DCCD-vel, amely képes megszüntetni az ATP képződéséhez szükséges lokális pH különbséget (Renganathan és Dilley, 1994) és az LHCII konformáció változásához szükséges  $\text{H}^+$  (és egyéb ion)-grádienseket is.

Elképzeléseink szerint az LHCII körül kialakult lokális  $\Delta\text{pH}$  nem szüntethető meg nigericinnel, ill. a lumen egészének pH változása csak kis mértékben befolyásolja a helyi  $\Delta\text{pH}$ -kat. Azonban az LHCII közvetlen protonálódásának gátlása jelentősen befolyásolja a szerkezetváltozás kialakulását. Így inkább a lokális  $\Delta\text{pH}$  szerepét kell kiemelnünk a struktúraváltozás szempontjából a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  helyett. Mindazonáltal ismét hangsúlyozandó, hogy ez nem jelenti azt, hogy a szerkezetváltozások közvetlenül összefüggenek a membrán fotokémiai aktivitásával, mivel a szerkezetváltozások izolált LHCII esetén is létrejönnek (lásd. 6.1 fejezet).

Összefoglalva: tehát a korábbi eredményekkel ellentétben azt találtuk, hogy a makrodomének struktúraváltozása a fotokémiai reakcióutaktól lényegében független folyamat.

### **6.3. A makrodomén struktúraváltozás fénygátlással szembeni szerepe - összehasonlítása a $q_E$ -vel**

A magas fény káros hatása elleni védekezés szempontjából igen fontos folyamat az energiafüggő nem-fotokémiai kioltás ( $q_E$ ). Több elképzelés született a  $q_E$  helyét és mechanizmusát illetően. A legszélesebb körben elfogadott nézet szerint a  $q_E$  kialakulása a transzmembrán  $\Delta pH$  és a xantofill ciklus működéséhez köthető. Ennek egy lehetséges mechanizmusát Horton és mtsi (1996) állították fel az LHCII tilakoid membránon belüli (korábban CD segítségével detektált) makrodomén szerveződése és annak változása ( $\Delta CD$ ) alapján.

Biokémiai és biofizikai bizonyítékok alapján valószínűsíthető, hogy a  $q_E$  kialakulása az LHCII struktúraváltozásához kötött, amely során létrejön a „kioltó”, amely valószínűleg maga az aggregált LHCII komplex (Walters és Horton, 1991).

Tehát feltételezhető, hogy a  $q_E$  kioltás és a makrodomének struktúraváltozása egymással összefüggő folyamat, ill. maga a struktúraváltozás felelős a  $q_E$  kialakulásáért. Ha ez így van, akkor azon gátlószerek ill. hatások, amelyek befolyásolják a tilakoid makrodomének struktúraváltozását, hasonló hatással lehetnek a  $q_E$ -re is.

Az antimycin A gátolja az 510-550 nm között detektálható fényszórás változást (Horton és mtsi 1991). Méréseink során az antimycin A és myxothiazol gátolta mind a

fényindukált fényzórás változást, mind a fényindukált CD változást. Ugyanakkor e két vegyület gátolja a fényindukált CD változást izolált LHCII esetén is, tehát valószínűleg közvetlenül az LHCII konformációváltozását gátolják. Valószínűleg ugyanezen mechanizmus alapján gátolják a  $q_E$ -t is. Méréseink során ezek a gátlószerek a PSII működésének hiányában is gátolták a fényindukált CD változást (15-19 ábra), tehát a gátlás intakt kloroplasztisz esetén is független a tilakoid membrán fotokémiai aktivitásától. Bár ezek a vegyületek gátolják a makrodomének struktúráváltozását, nincs kimutatható hatásuk a makrodomén szerveződés kialakulására (16. ábra).

Nem ismert, hogyan fejt ki gátló hatását ez a két vegyület. Megvizsgáltuk, van-e hatásuk más folyamatra is a kloroplasztiszban. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy ezek nem befolyásolják az elektrontranszportláncot (20. ábra) és a klororespirációt sem. Hatásuk nem magyarázható, mint detergens hatás sem, habár a fényindukált CD változást hasonlóan gátolják, de nincs hatásuk a lineáris elektrontranszportra, ellentétben a jól ismert detergenssekkel (21. ábra).

Más kinon-antagonista vegyületeknek (DBMIB és HQNO) is hasonló hatásuk van a fényindukált CD változásra, így feltételezéseink szerint az antimycin A és a myxothiazol is mint kinon antagonisták működnek (22. ábra). Feltevésünk szerint egy kis affinitású kinon kötőhelyen keresztül gátolják meg az LHCII makrodomének struktúráváltozását. Ha ez így van, akkor elképzelhető, hogy a szerkezetváltozások kialakulásához az LHCII konformációváltozása mellett kinon vegyületek bekötődése is szükséges. De erre még nincsenek bizonyítékaink. Ugyanígy még nem bizonyított közvetlenül az LHCII struktúráváltozásával kapcsolatos kinon kötőhely sem, mindenesetre eredményeink ezt sugallják.

Az LHCII protonálódásának fontos szerepe van mind a  $q_E$  kialakulásában mind pedig a makrodomének struktúraváltozásában. Ugyanúgy, mint a fényindukált CD változás, a  $q_E$  is gátolható DCCD-vel (14. ábra).

Kimutatták, hogy a minor antenna komplexeken a DCCD kötőhelye egyben  $Ca^{2+}$  ion kötőhely is (Webber és Gray, 1989), amely a  $Ca^{2+}$  ion szerepére is utalhat. Az általunk is használt A23187  $Ca^{2+}$  csatorna inhibitor gátolta a  $q_E$  kialakulását. (Walters és Horton, 1991). Eredményeink alapján azonban megállapítható, hogy - legalábbis a fényindukált CD változást illetően - ez a vegyület inkább a  $Mg^{2+}$  és más ionok transzportjának gátlásán keresztül befolyásolja a struktúraváltozásokat. Ezek után felmerülhet a kérdés, hogy milyen mechanizmus szerint gátol az A23178 ionofór ill. fontos-e az iontranszport a  $q_E$  kialakulása szempontjából. Ennek eldöntésére jelenlegi tudásunk nem elégséges.

A fényindukált CD változás fényintenzitás függése azt mutatja (10. ábra), hogy a struktúraváltozás magas fényintenzitás mellett válik meghatározóvá, amikor már az elektrontranszport elérte maximális értékét. Tehát a makrodomének struktúraváltozása képes „reagálni” a fotokémiai reakcióutak telítési szintje feletti fényintenzitásokra is. Ez nyilvánvalóan csak úgy lehetséges, ha a „reagálás” mechanizmusa nem fotokémiai reakciókhoz kötött, ezek ugyanis telítődnének és ezzel a reagálás mértéke már viszonylag alacsony fényintenzitás mellett függetlenné válna a túlgerjesztés mértékétől. E tulajdonság megerősíti feltételezett szerepét a magas fény káros hatásai elleni védelemben.

A  $q_E$  kialakulásának szempontjából elsőrendű fontosságú folyamatnak tekintik a fotoszintetikus elektrontranszport során kialakuló transzmembrán  $\Delta pH$ -t. Mint azt már az előbbieken részletesen leírtam nem találtunk szoros összefüggést a transzmembrán

$\Delta\text{pH}$  és a fényindukált struktúraváltozás között. Újabb közleményekben (Horton és mtsi, 1996) felmerül a kérdés, vajon tényleg a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  vagy inkább lokális  $\Delta\text{pH}$ -nak van szerepe a  $q_E$  kialakulásában is. Méréseink alapján, az LHCII konformációváltozása szempontjából mindenképpen a helyi  $\Delta\text{pH}$  szerepét kell hangsúlyozni. Ugyanakkor elképzelhető, hogy a transzmembrán  $\Delta\text{pH}$  szükséges a xantofill ciklushoz, amelynek gátlása, mint a  $q_E$  csökkenése detektálható, így közvetve maga a  $\Delta\text{pH}$  is befolyásolja a  $q_E$  kialakulását. Ezzel ellentmondó megállapításra jutottak Hurry és mtsi (1997), miszerint a zeaxantin mennyiségének növekedése nem befolyásolja a kialakult  $q_E$  nagyságát és így valószínűleg nincs hatással az LHCII konformációváltozására sem. Ugyanakkor nem ismerjük a pontos kapcsolatot a makrodomének struktúraváltozása és a xantofill ciklus között. Az ismert, hogy a  $q_E$  kialakulásában az LHCII konformációváltozása mellett a xantofill ciklus is fontos szerepet tölt be. Az is elképzelhető - és további vizsgálatokkal tisztázandó - hogy a xantofill ciklus működése befolyásolhatja a makrodomének szerkezetváltozását. Újabb eredmények azt mutatták, hogy a xantofill ciklus részt vesz az LHCII konformációváltozásának szabályozásában. A zeaxantin elősegíti az LHCII aggregált állapotának kialakulását, míg a violaxantin meggátolja az előbbi folyamatot (Ruban és mtsi, 1997). Gussakovsky és mtsi (1997) eredményei megerősítik az előbbieket. Megmutatták, hogy az aszkorbát megvédi a tilakoid membrán makrodomén komplexeit a hosszantartó erős megvilágítás káros hatásaival szemben. Az aszkorbát elősegíti a zeaxantin kialakulását violaxantinból, így végülis magas fényen való hatása a zeaxantin mennyiségének növekedésével magyarázható.

A két folyamat ( $q_E$  és makrodomének struktúraváltozása) összehasonlítása során fontos tisztázni, mely komplexek vesznek részt kialakításukban. Jelölt DCCD-vel végzett kísérletek megmutatták, hogy a DCCD az LHC minor antenna komplexekhez (főleg CP29) kötődik (Horton és mtsi, 1992). Ugyanakkor ezek a polipeptidek igen gazdagok violaxantinban, összehasonlítva az LHCII-vel. Az CP29 különösen nagy hatásfokkal képes a violaxantin - zeaxantin átalakításra (Bassi és mtsi, 1993). Más eredmények viszont azt mutatják, hogy az LHCII tölt be fontos szerepet a  $q_E$  kialakulásában (Ruban és Horton, 1995). Feltételezhető, hogy a magas fényvel szembeni védelem szempontjából mind az LHCII-nek, mind a minor antenna komplexeknek van szerepe (Walters és mtsi, 1994; Horton és mtsi, 1992; Ruban és mtsi, 1992; Crofts és Yerkes, 1994). Csoportunk eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a makrodomének fényindukált változásaiban a perifériális antenna komplexek vesznek részt, amely a szerkezetváltozásban az LHCII szerepét mutatja (Busheva és mtsi, 1991). Ugyanakkor mivel a DCCD kötőhelye a minor antennakomplexeken található és ezen komplexekhez való kötődése gátolja a fényindukált CD változást, így valószínűleg ezek is részt vesznek a szerkezetváltozásban.

Eddigi eredményeink ezért a  $q_E$  és az LHCII makrodomének struktúraváltozásának kapcsolatát valószínűsítik. Fontosnak tartjuk összefüggésük pontos tisztázásához e két folyamatot azonos körülmények között, egymással párhuzamosan végzett mérését. Ehhez azonban a két mérőrendszer pontos összehangolására lenne szükség és lényegében mindazon kiterjedt vizsgálatok megismétlésére, amit a  $q_E$ -vel kapcsolatban végeztek. Ez meghaladja a jelen munka kereteit.

#### 6.4. Kationok hatása

Barber és Chow (1979) munkájuk során megállapították, hogy a kloroplasztisz membránok stacking-jét (összetapadását) a negatív membránfelületet leárnyékoló kationok mennyisége és minősége határozza meg. Megállapították továbbá, hogy a kétértékű kationok sokkal hatásosabbak a membrán összetartása szempontjából, mint az egyértékűek, ugyanakkor nem találtak különbséget az azonos vegyértékű kationok hatása között. Ezért feltételezték, hogy a membránok összetartásában az ionok elektromos töltése a fontos nem pedig valamilyen speciális kémiai mechanizmus és a hatás leírására a Gouy-Chapman modellt használták. Megállapították, hogy a membrán stacking szempontjából az LHCI<sub>2</sub> nélkülözhetetlen.

Korábbi vizsgálatok alapján megállapították (Garab és mtsi, 1991), hogy a fényindukált CD változás amplitúdója függ a közeg ozmotikus nyomásától és az ionerősségtől. A közeg ozmotikus nyomása a membránon belüli packing kölcsönhatásért, míg a kationok a membránok közötti előbb leírt stacking kölcsönhatásért felelősek és a membrán felületek negatív töltéseinek leárnyékolásával fejtik ki hatásukat. A fényindukált CD változás pozitív ionoktól való függését leginkább Mg<sup>2+</sup> ionok jelenlétében vizsgálták. Munkám során több, különböző vegyértékű kation hatását tanulmányoztam, a korábbi vizsgálatoknál szélesebb koncentráció tartományban.

Megállapítható, hogy a pozitív töltések számának növekedésével a maximális fényindukált CD változás kialakításához kisebb ionkoncentráció szükséges (23. ábra). Azonos vegyértékű kationok ugyanúgy viselkednek a makrodomének struktúraváltozásának szempontjából. Ugyanez igaz a CD spektrumok kialakulására is.

Természetesen az azonos vegyértékű ionok csak akkor alakítanak ki hasonló nagyságú fényindukált CD változást, ha az ion és a membrán között nem alakul ki valamilyen speciális kölcsönhatás. Ilyen a kísérleteink során vizsgált  $\text{La}^{3+}$  ion, amely erősen kötődik a membránhoz, ezáltal meggátolva a struktúraváltozást.

Ez az ionfüggés végeredményben megegyezik a korábban a membrán stacking-re kapott ionfüggéssel, amely azt mutatja, hogy a membránok közötti stacking fontos a fényindukált CD változás szempontjából. Barber (1980) által feltételezett modell alapján a tilakoid membrán stacking-jét befolyásolja a membrán fluiditása is, pl. a hőmérséklet csökkenése csökkenti a stacking kialakulását. Az alacsony hőmérsékletnek hasonló hatása van a fényindukált CD változásra és ugyan kisebb mértékben, de a makrodomének kialakulására is (lásd. 6.1. fejezet), amely megerősíti a két folyamat kapcsolatát.

A maximális CD amplitúdó és fényindukált CD változás elérése után a kationok koncentrációjának további növelésével mind a CD spektrum, mind pedig a fényindukált CD változás amplitúdója csökken a vizsgált ionok esetében. A fényindukált változás csökkenése sokkal erőteljesebb, sőt a legtöbb vizsgált kationnál megszűnik, míg a CD spektrum majdnem változatlan marad, csak amplitúdója csökken. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a kationok koncentrációjának növelésével a makrodomén aggregáció létrejön, viszont a kationok túl nagy koncentrációja olyan erősen tartja össze a membránokat, ami megakadályozza a struktúraváltozás kialakulását.

A spermidin és spermin esetén kialakult fényindukált CD változás maximális amplitúdója különbözik a  $\text{Mg}^{2+}$  és a  $\text{K}^+$  ionétól (26., 27. ábra). Ez a különbség valószínűleg e vegyületek tilakoid membránra gyakorolt speciális tulajdonságából adódik. A poliaminok feltételezhetően szerepet játszanak a membrán stabilizálásában.



Ezért választottuk modellként ezeket a vegyületeket, mert elképzelhetőnek tartottuk, hogy a membrán negatív töltéseinek leárnnyékolása és így a membránok közötti összetartás erősítése által fejtik ki stabilizáló hatásukat. Mindkét vegyület a  $Mg^{2+}$  ionhoz hasonló nagyságú maximális CD spektrumot alakít ki (a spermidin még nagyobb is), ugyanakkor sokkal kisebb az ezen ionok hatására létrejött fényindukált CD változás. Tehát ezen kationok jelenlétében is kialakul a makrodomén szerveződés, ugyanakkor a struktúraváltozás gátolt. Valószínűleg ugyanúgy, mint az egy- ill. kétértékű ionok nagy koncentrációja esetén, a poliaminok is olyan erős kölcsönhatást hoznak létre a membránok között, amely már meggátolja a makrodomének szerkezetváltozását. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy ezek a kationok nem képesek a  $Mg^{2+}$  és  $K^+$  ionhoz hasonlóan részt venni - a fényindukált CD változásban minden valószínűség szerint kulcsszerepet játszó - másodlagos ionmozgásokban.

Mint az eddig elmondottakból jól látszik, a kationok fontos szerepet játszanak az LHCI makroaggregátumok struktúraváltozásában. A kationok hatása a stacking, a membránok közötti kölcsönhatás erősítésének tulajdonítható.

Mivel a makrodomének a membránban foglalnak helyet, így a membránok közötti és esetleg a fehérjék és lipidek közötti kölcsönhatás (lásd. 6.1 fejezet) megváltoztatása hatással lehet a membrán egészének általános tulajdonságaira is. Ezzel kapcsolatban a tilakoid membrán ionokra való permeabilitásának változását vizsgáltuk (33. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a megvilágítás hatására bekövetkező szerkezetváltozások és az ezt kísérő ionmozgások - várakozásainkkal ellentétben - lényegében nem befolyásolják a membrán permeabilitását. Ez arra utal, hogy az ionmozgások közvetlenül a stacking-hez ill. annak feltételezett változásához rendelhetők.

Fény hatására a tilakoid membrán két oldalán felépül a pH különbség, amely másodlagos iontranszporttal párosul (legfontosabb a  $Mg^{2+}$  transzport), amely a lumenből a sztrómába irányul és nagysága kb. 2 mM (ha a pH = 7.6 és  $300 W/m^2$  a megvilágító fény intenzitása) (Krause, 1977). Nem zárható ki a másodlagos iontranszport összefüggése az általunk megfigyelt szerkezetváltozásokkal. Ennek részletes vizsgálata előttünk álló feladat.

A munka eddigi szakaszában vizsgáltuk a  $Mg^{2+}$  ion fényindukált felszabadulását Eriochrome Blue SE metallokróm indikátor segítségével. A  $Mg^{2+}$  ion felszabadulásának és a fényindukált CD változásnak a fényintenzitás függése jól egyezik egymással. Sem a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulásának sebessége, sem a fényindukált CD változás nem mutat telítést a vizsgált tartományban, így nem köthető a fotokémiai reakcióutak változásához. A  $Mg^{2+}$  ion koncentrációjának növelése hasonló mértékű változást okoz mind a fényindukált CD változásban mind a  $Mg^{2+}$  ion transzportjában (4. táblázat). Megállapítottuk azt is, hogy az A23187 Ca-ionofór gátolja mind a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulását, mind pedig a makrodomének struktúraváltozását.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a  $Mg^{2+}$  ion felszabadulása összefügg a tilakoid membrán makrodoménjeinek struktúraváltozásával, viszont nem tudjuk, hogy kizárólagosan a  $Mg^{2+}$  vagy  $Ca^{2+}$  ion felszabadulása fontos, vagy más kation is (pl.  $K^+$ ,  $Na^+$ ) hasonló hatást fejt-e ki. Mivel a membrán stacking és a makrodomén szerveződés szempontjából a kationok hatása nem specifikus, csak a kation töltésétől függ, feltételezhető, hogy ugyanez igaz a szerkezetváltozásokkal kapcsolatos másodlagos ionmozgásokra is.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Zöld növényekben a reakciócentrum direkt gerjesztése nagyon ritka esemény, még magas fényen is (Junge, 1977b). Ehelyett az antenna molekulák nyelik el a gerjesztési energiát, amely azután a reakciócentrumba jut. Minden reakciócentrum néhány száz klorofill és karotenoid kromofórral van kölcsönhatásban. Az antenna pigment-protein komplexek molekuláris felépítése magasan szervezett. Megfelelő körülmények között (ozmotikus nyomás, kationok elektrosztatikus árnyékoló hatása) képesek makrodoménekbe rendeződni, amely a hosszútávú energia átadást biztosítja. A makrodomének kialakulása és szerkezetének változása CD spektroszkópiával jól vizsgálható. A makrodomének tulajdonságai a psi-típusú makroaggregátumokra vonatkozó CD elmélettel írhatók le.

Munkám során e makrodomének fényindukált, reverzibilis struktúraváltozásait vizsgáltam intakt kloroplasztiszon és izolált tilakoid membránokon. Megmutattam, hogy

- A makrodomén szerveződés változása fotofizikai reakcióutak változásával kapcsolódik össze, magas fény hatására a disszipáció mértéke átmenetileg nő.
- A korábbi eredményekkel ellentétben azt találtuk, hogy a makrodomének struktúraváltozása független a lineáris elektrontranszporttól és transzmembrán  $\Delta\text{pH}$ -tól. Ugyanakkor a makrodomének struktúraváltozása - helyi - az LHCII körül kialakult lokális  $\Delta\text{pH}$ -kal összefügghet. A fényindukált CD változás kialakulása izolált LHCII-n is a fotokémiai reakcióutaktól való függetlenségét bizonyítja.
- A makrodomének struktúraváltozása magas fényintenzitáson játszódik le, ahol már a fotokémiai reakcióutak telítettek. A változások mértéke ezen tartományban arányos a

„túlgerjesztés” intenzitásával. Ily módon a tilakoid membránok - a fotokémiai telítés feletti tartományban is - képesek a fényintenzitással arányos válaszreakcióra.

- A fényindukált CD változás gátolható a nem-fotokémiai, energiafüggő gerjesztési energia kioltás ( $q_E$ ) ismert gátlószereivel (antimycin A, myxothiazol, DCCD, stb.). Valószínűnek tűnik ezért, hogy a  $q_E$  kialakulása szempontjából a makrodomén struktúraváltozása fontos folyamat.
- Hipotézisünk szerint makroaggregátumokban a szerkezetváltozásokért a fényenergia disszipációja tehető felelőssé és első közelítésben jól leírható a folyadékkristályokban megfigyelt termooptikus effektus segítségével. E hipotézis mellett szól az is, hogy magas hőmérsékleten (35-40 °C fölött) a makrodomének elveszítik stabilitásukat.
- A makrodomének struktúraváltozása nem jön létre kationok hiányában. Mind a kationok jelenlétének mind ezek mozgásának fontos szerepe van a makrodomének képződésében és dinamikus sajátágukban.

Összefoglalva, a makrodomének struktúraváltozásának részletes vizsgálatával megállapítottuk, hogy a tilakoid membránok antennarendszerében egy eddig nem ismert mechanizmus révén szerkezetváltozások következnek be, melyek sebessége - a telítési fényintenzitás felett - egyenesen arányos módon függ a fény intenzitásától. Ez a szerkezetváltozás módosítja a fotofizikai reakcióutakat és ezért valószínűnek tűnik, hogy szerepet játszik a fényadaptációs szabályozási mechanizmusban ill. a növények magas fény elleni védekezésében.

## FELHASZNÁLT IRODALOM

- Allen J.F. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 275-335
- Anderson J.M. and Andersson B. (1988) *Trends in Biol. Sci.* 13, 351-355
- Anderson J.M. and Osmond C.B. (1987) in *Photoinhibition* (Kyle D.J., Osmond C.B. and Arntzen C.J. eds.), pp. 1-38, Elsevier, Amsterdam
- Arnon D.I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15
- Arnon D.I. and Tang G.M.S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9524-9528
- Atkins P.W. (1992) in *Physical Chemistry*, pp. 792-794, Oxford University Press
- Barabás K. and Garab G. (1989) *FEBS Lett.* 248, 62-66
- Barabás K., Zimányi L. and Garab G. (1985) *J. Bioenerg. Biomembr.* 17, 349-364
- Barber J. (1976) in *Topics in Photosynthesis: The Intact Chloroplast* (Barber J. ed.), vol. 1, pp. 89-134, Elsevier, Amsterdam
- Barber J. (1980) *FEBS Lett.* 118, 1-10
- Barber J. and Chow W.S. (1979) *FEBS Lett.* 105, 5-10
- Barber J., Mills J. and Love A. (1977) *FEBS Lett.* 74, 174-181
- Barzda V., Garab G., Gulbinas V. and Valkunas L. (1996a) *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 231-236
- Barzda V., Istokovics A., Simidjiev I. and Garab G. (1996b) *Biochemistry* 35, 8981-8985
- Barzda V., Mustárdy L. and Garab G. (1994) *Biochemistry* 33, 10837-10841
- Bassi R., Pineau B., Dianese P. and Marquardt J. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 297-303
- Ben-Hayyin G. and Krause G.H. (1980) *Arc. Biochem. Biophys.* 202, 546-557
- Bennett J. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 281-311

- Bennoun P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4352-4356
- Bilger W., Heber U. and Schreiber U. (1988) *Naturforsch* 43, 877-887
- Briantais J.-M., Dacosta J., Goulas Y., Ducruet J.M. and Moya I. (1996) *Photosynth. Res.* 48, 189-196
- Briantais J.-M., Vernotte C., Picaud M. and Krause G.H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548, 128-138
- Briantais J.-M., Vernotte C., Picaud M. and Krause G.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 591, 198-202
- Busheva M., Garab G., Liker E., Tóth Zs., Széll M. and Nagy F. (1991) *Plant Physiol.* 95, 997-1003
- Calberg I., Bingsmark S., Vennigerholz F., Larsson U.K. and Andersson B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1099, 111-117
- Chow W.S., Thorne S.W., Duniec J.T., Sculley M.J. and Boardman N.K. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 347-355
- Crofts A.R. and Yerkes C.T. (1994) *FEBS Lett.* 352, 265-270
- Dainese P. and Bassi R. J. (1991) *Biol. Chem.* 66, 8136-8142
- Dainese P., Santini C., Ghirette-Magaldi A., Marquardt J., Tidu V., Mauro S., Bergantino E. and Bassi R. (1992) in *Research on Photosynthesis* (Murata N. ed.) vol. II, pp. 13-20. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Deamer D.W., Crofts A.R. and Packer L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 131, 81-86
- Demmig-Adams B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1016, 219-227
- Demmig B. and Winter K. (1988) *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 163-177
- Droppa M., Demeter S., Rózsa Zs. and Horváth G. (1981) *Z. Naturforsch* 36, 109-114
- Duniec J.T., Sculley M.J. and Thorne S.W. (1979) *J. Theor. Biol.* 79, 473-484
- Duniec J.T. and Thorne S.W. (1977) *J. Bioenerg. Biomembr.* 9, 223-235
- Faludi-Dániel Á., Demeter S. and Garay A.S. (1973) *Plant Physiol.* 52, 54-56
- Faludi-Dániel Á. and Mustárdy L.A. (1983) *Plant Physiol.* 73, 16-19

- Faludi-Dániel Á., Mustárdy L., Shubin V.V. and Sobhin M.A. (1984) in *Advances in Photosynthesis Research* (Sybesma C. ed.) vol. 4, pp. 733-736. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague, The Netherlands.
- Finzi L., Bustamante C., Garab G. and Juang C-B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8748-8752
- Förster T. (1965) in *Modern Quantum Chemistry* (Sinanoglu O. ed.) part III, pp. 93-137, Academic Press, New York
- Garab G., Faludi-Dániel A., Sutherland J.C. and Hind G. (1988a) *Biochemistry* 27, 2425-2430
- Garab G., Kieleczawa J., Sutherland J.C., Bustamante C. and Hind G. (1991) *Photochem. Photobiol.* 54, 273-281
- Garab G., Lajkó F., Mustárdy L. and Márton L. (1989) *Planta*, 349-358
- Garab G., Leegood R.C., Walker D.A., Sutherland J.C. and Hind G. (1988b) *Biochemistry* 27, 2430-2434
- Garab G., Wells K.S., Finzi L. and Bustamante C. (1988c) *Biochemistry* 27, 5839-5843
- Genty B., Harbinson J., Briantais J-M. and Baker N.R. (1990) in *Current Research in Photosynthesis* (Baltscheffski M. ed.) vol 4., pp. 365-368, Cluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London
- Gilmore A.M., Hazlett T.L. and Govindjee (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2273-2277
- Gilmore A.M. and Yamamoto H.Y. (1993) *Photosynth. Res.* 35, 67-78
- Green B.R., Pichersky E. and Kloppstech K. (1991) *Trends in Biol. Sci.* 16, 181-186
- Gregory, R.P.F. (1975) *Biochem. J.* 148, 487-497
- Gross E.L. and Prasher S.H. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 460-468
- Gussakovsky E.E., Barzda V., Shahak Y. and Garab G. (1997) *Photosynth. Res.* 51, 119-126
- Hind G., Nakatani H.Y. and Izawa S. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1484-1488
- Horton P. and Hague A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 932, 107-115
- Horton P. and Ruban A.V. (1992) *Photosynth. Res.* 34, 375-385

- Horton P., Ruban A.V., Rees D., Pascal A.A., Noctor G. and Young A.J. (1991) *FEBS Lett.* 292, 1-4
- Horton P., Ruban A.V. and Walters R.G., (1992) in *Research on Photosynthesis* (Murata N. ed.), vol I., 311-314. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Horton P, Ruban V.A. and Walters R.G. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684
- Horváth G., Droppa M., Fodorpataki L., Istokovics A., Garab G. and Oettmeier W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3876-3880
- Hurry V., Anderson J.M., Chow W.S. and Osmond C.B. (1997) *Plant Physiol.* 113, 639-648
- Izawa S. (1979) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Trebst A. and Avron M. eds.) New Series vol. 5, pp. 266-282, Springer-Verlag, Berlin
- Jánossy I. (1991) in *Optical Effects in Liquid Crystals*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Jansson S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1-19
- Junge W. (1977a) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 503-536
- Junge W. (1977b) in *Photosynthesis I., Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation* (Trebst A. and Avron M ed.), pp. 59-93, Springer-Verlag, Berlin
- Junge W., Auslander W., McGeer A.J. and Runge T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 546, 121-141
- Karlin-Neuman G.A., Kohorn B.D., Thornber J.P. and Tobin E.M. (1985) *J. Mol. Appl. Genet.* 3, 45-61
- Keller D. and Bustamante C. (1986) *J. Chem. Phys.* 84, 2972-2979
- Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K.A. and Ghanotakis D. (1993) *Photosynth. Res.* 38, 83-88
- Krause G.H. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 301-313
- Krause G.H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 460, 500-510
- Krause G.H., Vernotte C. and Briantais J.-M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 679, 116-124



- Krieger A., Moya I. and Weiss E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 167-176
- Kühlbrandt W. (1984) *Nature* 307, 478-480
- Kühlbrandt W. (1994) *Current Opinion in Structural Biology* 4, 519-528
- Kühlbrandt W., Wang D.N. and Fujiyoshi Y. (1994) *Nature* 367, 614-621
- Liker E and Garab G. (1995) *Physiol. Plant.* 93, 187-190
- Maenpaa P. and Andersson B. (1989) *Z. Naturforsch.* 44, 403-406
- Marder J.B. and Barber J. (1989) *Plant, Cell and Environment* 12, 595-614
- Mullett, J.E. and Arntzen C.J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 589, 100-117
- Mullett J.E., Arntzen C.J. and Kühlbrandt W. (1984) *Nature* 307, 478-480
- Nanba O. and Satoh K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 109-112
- Nedbal L., Samson G. and Whitmarsh J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7929-7933
- Noctor G., Rees D., Young A.J. and Horton P. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 320-330
- Nussberger S., Dorr K., Wang D.N. and Kühlbrandt W. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, 347-356
- Ortega J.M., Hervás M. and Losada M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 975, 244-251
- Peter G.F. and Thornber J.P. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16745-16754
- Popovic R.B., Kyle D.J., Cohen A.S. and Zalik S. (1979) *Plant Physiol.* 64, 721-726
- Ravenel J. and Peltier G. (1991) *Photosynth. Res.* 28, 141-148
- Reed P.W. and Lardy H.A. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6970-6977
- Rees D., Young A.J., Noctor G., Britton G. and Horton P. (1989) *FEBS Lett.* 256, 85-90
- Renganathan M. and Dilley R.A. (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 117-125
- Roberts D.R., Dumbroff E.B. and Thompson J.E. (1986) *Planta* 167, 395-401

- Ruban V.A. and Horton P. (1995) *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 221-230
- Ruban A.V., Phillip D., Young A.J. and Horton P. (1997) *Biochemistry* 36, 7855-7859
- Ruban A.V., Walters R.G. and Horton P. (1992) *FEBS Lett.* 309, 175-179
- Schreiber U. and Berry J.A. (1977) *Planta* 136, 233-238
- Schreiber U. and Neubauer C. (1990) *Photosynth. Res.* 25, 279-293
- Simidjiev I., Barzda V., Horváth I. And Garab G. (1997) in press
- Sivak M.N., Dietz K.-J., Heber U. and Walker D.A. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 237, 513-519
- Staehelein L.A. (1976) *J. Cell Biol.* 71, 136-158
- Sundby C. and Andersson B. (1985) *FEBS Lett.* 191, 24-28
- Thierbach G. and Reinbach H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 638, 282-289
- Thomas P.G., Quinn P.J. and Williams W.P. (1986) *Planta* 167, 133-139
- Trebst A. (1980) *Methods in Enzymol.* 69, 675-715
- Vasil'ev S., Irrgang K.D., Schrötter T., Bergmann A., Eichler H.J. and Renger G. (1997) *Biochemistry* 36, 7503-7512
- Walters R.G. and Horton P. (1991) *Photosynth. Res.* 27, 121-133
- Walters R.G., Ruban A.V. and Horton P. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226, 1063-1069
- Webber A.N. and Gray J.C. (1989) *FEBS Lett.* 249, 79-82
- Withmarsh J. and Ort D.R. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 378-389
- Wraight C.A. and Crofts A.R. (1979) *Eur. J. Biochem.* 17, 319-327
- Yerkes C.T. and Crofts A.R. (1992) in: *Research on Photosynthesis* (Murata N. ed.) vol II, pp. 635-638. Kluwer Academic Press, Dordrecht.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Garab Győzőnek munkám során nyújtott segítségét, tanácsait. Megköszönöm Prof. Dudits-Dénesnek a Növénybiológiai Intézet igazgatójának, hogy biztosította a feltételeket a kísérletek elvégzéséhez. Munkatársaim, Virginijus Barzda, Ilian Simidjiev, Lajkó Ferenc, Liker Erika és Tóth Zsuzsa sok segítséget nyújtottak. Külön köszönöm Zsiros Ottónak, hogy segített Japán és Magyarország közötti távolság áthidalásában.

A dolgozatom elkészüléséhez a Hokkaido National Industrial Research Institute (Japán) minden technikai feltételt biztosított.

## Summary

In photosynthesis, the primary step in the conversion of light energy into chemical energy occurs in the reaction centers, which represents only a small fraction of the total pigment content of photosynthetic membranes. Direct excitation of the reaction centers is a very rare event even under strong sunlight. In all photosynthetic organisms the light energy is predominantly captured by antenna pigments.

The efficiency of the energy migration toward the reaction centers is largely determined by the molecular architecture of the pigment system. Under 'normal conditions', the antenna system minimizes the quantum losses and supplies the excitation energy to the reaction centers. On the other hand, considerable evidence has been accumulated for the existence of a protective mechanism in saturating light, such as  $\Delta\text{pH}$ -dependent non-radiative energy-dependent dissipation ( $q_E$ ), which can bring about dissipation of 80 % of the absorbed light energy. Recent data suggest that this non-photochemical dissipation occurs via reorganizational changes in the antenna system of thylakoid membranes and involves macroaggregates of antenna complexes. This, by preventing photoinhibitory damage to the photosynthetic machinery, is thought to play a protective role. In general, the multilevel regulatory processes, which are capable of regulating the photosynthetic energy conversion, appear of great importance in stress physiology and plant productivity.

However, our understanding of the molecular architecture of the antenna system of chloroplasts is far from being complete, and relatively little is known about the molecular mechanisms leading to regulatory changes in the photophysical pathways.

By means of circular dichroism (CD) spectroscopic techniques, it has been shown that in granal thylakoid membranes PSII particles are assembled into psi-type (polymer or salt

induced) macroaggregates, densely packed chirally organized macroarrays with an estimated diameter of 200-400 nm, the stability and size of which are controlled by the ionic strength and the osmotic pressure of the medium and the peripheral LHCII content of the membranes.

It has also been shown by CD spectroscopy that thylakoid membranes are capable of undergoing light-induced reversible changes in the chiral macroorganization of the chromophores in thylakoid membranes. It was shown that all major psi-type CD bands, which originate from chirally organized macrodomains display gross (up to 80 %) reversible light-induced changes ( $\Delta$ CD). Experiments with uncouplers showed that these structural changes could be inhibited with nigericin and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and penetrating buffers, which suggested the role of  $\Delta$ pH in the structural rearrangements. In other terms, it was proposed that the structural changes detected as  $\Delta$ CD were driven by the photochemical activity of the membranes. However, more recent data obtained during our investigations ruled out this mechanism. Thus, in order to elucidate the mechanism of the light-induced reversible structural changes it was necessary to conduct systematic investigations on isolated thylakoid membranes.

In this work we characterized in detail the structural changes of macrodomains in granal thylakoids, and propose a novel mechanism for the light-induced structural reorganization of the antenna system, which are associated with the regulation of the dissipative pathways.

*The main topics of my thesis are:*

- correlation between the macrodomain reorganization and the linear electron transport, and the transmembrane  $\Delta$ pH
- temperature dependence of light-induced reorganization of thylakoid membranes
- correlation between light-induced reorganization of thylakoid membranes and  $q_E$ : inhibition by quinone antagonists (antimycin, myxothiazol) and other inhibitors of  $q_E$  (DCCD)
- effect of cations and the  $\text{Mg}^{2+}$  uptake

### *New results:*

- The structural changes induced by high light intensities (and detected as light-induced reversible changes in the psi type CD) are accompanied by changes in the photophysical pathways, which manifest themselves in alterations in the chlorophyll fluorescence induction, and more specifically in an increased dissipation of the excitation energy.
- The structural changes show a characteristic temperature dependence, their rate gradually increases with the temperature, between 2 and about 33 °C, and abruptly disappears above 35-40 °C. As for the origin of  $\Delta$ CD, it is proposed to originate from the decrease in the CD signal due to a thermo-optic effect, i.e. thermal fluctuations, provoked photophysically, that lead to a diminishment of the long range chiral order.
- The light induced reversible changes in the thylakoid membranes are not driven directly by the photosynthetic electron and proton transport although it is facilitated by the build up of a local proton gradient around a proton binding domain, probably LHCII or one of its minor complexes.
- Inhibitors of  $q_E$  (antimycin A, myxothiazol, DCCD) also inhibit  $\Delta$ CD. Thus the two phenomena appear to be at least indirectly correlated. However  $q_E$  is defined to depend strictly on  $\Delta$ pH whereas  $\Delta$ CD is shown not to depend on (only somewhat facilitated by) the transmembrane and local proton gradient. The fact that both  $\Delta$ CD and the fluorescence transients, similar to those referred to as  $q_E$ , are amplified at light intensities that exceed the saturation for the electron and proton transport, strongly suggests that the photophysically induced structural changes play a role in the reversible fluorescence quenching.
- The light-induced reversible structural changes require the presence of cations and are correlated with the release of  $Mg^{2+}$  ions.

These findings, and the observation that lamellar aggregates of purified LHCII and thylakoid membranes exhibit very similar light-induced reversible changes, show that there is a molecular mechanism by the aid of which the structure of the photophysical apparatus can be reversibly changed as a function of light intensity. These structural changes also depend on (micro)environmental factors, such as the ambient temperature and ionic strength of the medium, and can be specifically inhibited by several types of chemical agents.

The exact role of this novel, photophysical mechanism in the dissipation of the excess excitation energy and in the adaptation of plants to high light is not known. The presently available data suggest that it plays a role in the down-regulation of the photosynthetic activity of granal membranes and thus in the protection of plants against damage in high irradiation.