

**A FOTOSZINTETIKUS OXIGÉNFEJLŐDÉS MECHANIZMUSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Egyetemi doktori disszertáció

DEÁK ZSUZSANNA

témavezető

Dr. VASS IMRE

biol. tud. kand.

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
NÖVÉNYÉLETTANI INTÉZET

Szeged
1993

TARTALOM

1.	BEVEZETÉS	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1.	A fotoszintetikus elektrontranszportlánc és a Z-séma	4
2.2.	A PSII fehérje szerkezete	6
2.3.	A fotoszintetikus oxigénfejlődés	9
2.4.	A Kok modell	11
2.5.	Az S_0 állapot stabilitása	15
3.	CÉLKITÚZÉSEK	16
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1.	A minták előkészítése	17
4.1.1.	Tilakoid membrán izolálása	17
4.1.2.	A <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 cianobaktérium nevelése	17
4.1.3.	A <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> és <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> algák nevelése	18
4.2.	A Joliot típusú oxigén elektród és a hozzá kapcsolódó mérőberendezés leírása	18
4.3.	A fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés mérése	19
4.4.	A folyamatos megvilágítással indukált oxigénfejlődés mérése	21
4.5.	Az elektron spin rezonancia mérése	21
4.6.	Az abszorpció változás mérése	21
4.7.	A termolumineszcencia mérése	22
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	23
5.1.	Az S_0 állapot stabilitása	23
5.2.	Az S_2 és S_3 állapotok lecsengése a sötétadaptálási idő függvényében	25
5.3.	A redukált Tir-D donor hatása az S_2 , S_3 állapotok lecsengésére	27
5.4.	A Kok modell módosítása	32
5.5.	A Tir-D lassú redukciója -70°C hőmérsékleten	36
5.6.	Az S_2 , S_3 állapotok lecsengésének hőmérsékletfüggése	42
5.7.	A 33 kDa-os protein szerepének vizsgálata	46
5.8.	A fotoheterotróf nevelési körülmények hatása a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> zöld alga oxigénfejlődésére	51
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	55
7.	IDÉZETT IRODALOM	58
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	63

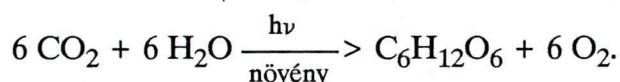
RÖVIDÍTÉSEK

ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	bovin szérum albumin
Chl	klorofill
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-izopropil- <i>p</i> -benzokinon
DCMU	3-(3',4'-diklór-fenil)-1,1-dimetil-karbamid
DCPIP	2,6-diklór-fenol-indofenol
DCQ	2,6-dikloro- <i>p</i> -benzokinon
E _a	aktiválási energia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ferricianid	kálium-(hexaciano-ferrát-III)
HEPES	N-(2-hidroxi-etil)-piperazin-N'-2-etánszulfonát
M	vízbontó enzim a második fotokémiai rendszer donor oldalán
MES	2-N-morfolino-etánszulfonát
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
PSI	az első fotokémiai rendszer
PSII	a második fotokémiai rendszer
Q _A	a második fotokémiai rendszer elsődleges kinon akceptora
Q _B	a második fotokémiai rendszer másodlagos kinon akceptora
S _n	a vízbontó enzim oxidációs állapotai
Tir-D	a második fotokémiai rendszer D ₂ proteinjének 161-es tirozinja
Tir-Z	a második fotokémiai rendszer D ₁ proteinjének 161-es tirozinja
α, β, γ	az S állapotok közti különböző átmenetek valószínűségei

1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis az élet *sine qua non*-ja, az az alapvető folyamat, mely lehetővé teszi, hogy a földi élet az általunk ismert és csodált sokezer színében pompázzon.

A fotoszintézis biológiai, kémiai és fizikai reakciók alkotta összetett folyamat, melyben a gyakorlatilag korlátlanul rendelkezésre álló fényenergia szerves vegyületek kémiai kötéseinek energiájává alakul. Az oxigénfejlesztő fotoszintetizáló szervezetek vizet használnak elektrondonorként a szén-dioxid redukciójához, miközben molekuláris oxigént szabadítanak fel és energiában gazdag szerves vegyületeket képeznek. Ezen komplex reakció összefoglaló egyenlete a következőképpen írható:



Hosszú évek intenzív kutatómunkájának eredményeként ma már tudjuk, hogy a fotoszintézis a növényekben két alapvetően különböző folyamatból tevődik össze. Az egyik az elsődleges vagy fényreakció, melynek során a Nap sugárzási energiáját az antenna pigment molekulák (klorofillok, karotinoidok, fikobiliproteinek stb.) abszorbeálják. Az elnyelt energia elektrongerjesztési energiaként adódik át a reakciócentrum klorofill-*a* molekuláinak, majd kémiai energiává alakul a gerjesztett állapot indukálta töltésszétválasztással. A reakciók másik típusa a másodlagos vagy sötétreakció, melynek során a szétvált, stabilizálódott töltések a szén-dioxid redukcióját és a víz oxidációját eredményezik. A vízmolekula elbontásával molekuláris oxigén, protonok és elektronok szabadulnak fel, ez utóbbi kettő a kémiai energia (ATP szintézis) illetve a redukáló erő (NADPH) kialakításában hasznosítódik. A létrehozott NADPH és ATP szolgál a szén-dioxid megkötésének és szénhidrátokká való redukciójának energiaforrásaként.

A vízbontás folyamata és a molekuláris oxigén felszabadulása a fotoszintézis során lejátszódó reakciók legkevésbé ismert része. Ezért választottuk dolgozatunk témájául a fotoszintetikus oxigénfejlődés mechanizmusának elméleti és kísérleti vizsgálatát. Az ehhez kapcsolódó munkák ma még főként alapkutatási szempontból jelentősek, de a jövőben ezek az ismeretek a világméretű élelmezési, környezet-szennyezési, energiagazdálkodási problémák megoldásában is szerepet játszhatnak.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc és a Z-séma

A magasabb rendű növényekben, algákban és cianobaktériumokban a fotoszintézis fotofizikai és fotokémiai reakciói két szerkezetileg elkülönült egységben, az első és második fotokémiai rendszerben (photosystem I, PSI; photosystem II, PSII) mennek végbe. Funkcionálisan azonban nem függetlenek egymástól, a donor és akceptor oldali redox komponensek valamint a citokróm *b/f* komplex által megvalósított fotoszintetikus elektrontranszportlánc összekapcsolja a két fotokémiai rendszert. Ezek együttműködését vázlatosan a Hill és Bendall (1960) által bevezetett ún. Z-séma mutatja be az 1. ábrán, melyen az elektrontranszportlánc komponensei középponti redoxpotenciáljaik szerint vannak feltüntetve.

A PSI felelős a NADPH kialakulásáért, a PSII pedig a víz oxidációját biztosítja. A víz/oxigén rendszer redoxpotenciálja +0.8 V. Innen kell az elektronoknak a -0.32 V redoxpotenciálú NADPH/NADP⁺ rendszerbe felemelkedni (összefoglalásként ld. Szalay és Lehoczki, 1979). Az ehhez szükséges energiát a reakciócentrum klorofillok (P₆₈₀ a PSII és P₇₀₀ a PSI esetében) által elnyelt fotonok energiája szolgáltatja. Ezen klorofillok gerjesztett állapota teszi lehetővé az elsődleges töltésszétválasztást, mely által a fényenergia kémiai energiává alakul. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc további lépéseiben az elektronok a redoxpotenciálok által megszabott irányba vándorolnak.

A fotoszintézis elsődleges reakciói: Az elektronáramlás akkor indul meg, amikor a reakciócentrumok fény hatására gerjesztett állapotba kerülnek (a gerjesztett állapotok jelölése P₆₈₀^{*} és P₇₀₀^{*}). A P₆₈₀^{*} gerjesztési energiája kémiai energiává alakul át azzal, hogy megtörténik a töltésszétválasztás, azaz mintegy 3 pikoszekundum alatt kialakul a P₆₈₀⁺ kation és a feofitin⁻ (Pheo) anion (Wasielewski és mtsai, 1989). A P₆₈₀⁺ hiányzó elektronját a Z-vel jelölt másodlagos elektrondonortól kapja meg. Az elnevezést az indokolja, hogy elsődleges elektrondonornak maga a reakciócentrum tekinthető. A P₇₀₀^{*} első reakciójához, a P₇₀₀⁺A₀⁻ töltésszétválasztáshoz 10 pikoszekundum szükséges. Itt A₀ egy speciális klorofill-*a* molekula.

A PSII másodlagos reakciói: A Z donoron lévő pozitív töltés az M-mel jelölt töltésgyűjtőre, a vízbontó enzimre kerül. Itt történik a víz oxidációja és az oxigén felszabadulása. A Pheo⁻ elektronját 400-500 pikoszekundum alatt az elsődleges elektronakceptor (Q_A) adja át (Schatz és mtsai, 1987; Eckert és mtsai 1987).



A Q_A egy speciális plasztokinon molekula és tudománytörténeti okokból viseli az "elsődleges" nevet. Innen az elektron 400-500 mikroszekundum alatt a másodlagos akceptorra (Q_B) kerül (Crofts és Wraight, 1983), mely két elektron tárolására alkalmas speciális plasztokinon molekula. A Q_B egyszeresen redukált állapota viszonylag stabilis, míg a kétszeresen redukált állapota gyorsan visszaalakul oxidált állapotá, miközben két elektron továbbítódik a 6-12 plasztokinon molekulából álló plasztokinon gyűjtő (PQ) felé (Veltuys, 1982).

A cyt b_6/f komplex reakciói: A kétszeresen redukált plasztokinon egyik elektronját a vasat és kén tartalmazó ún. Rieske-féle vas-kén centrumnak (R-Fe-S) adja, a másik elektronját pedig a citokróm b_L (cyt b_L) komponens veszi át. A R-Fe-S centrumon lévő elektron redukálja a citokróm f (cyt f) komponensre, a citokróm b_L -en lévő pedig a citokróm b_H (cyt b_H) komponensre kerül, ahol egy ciklikus elektrontranszport elemévé válik (ún. Q-ciklus) (összefoglalásként ld. Demeter és Govindjee, 1989).

A PSI másodlagos reakciói: A redukált citokróm f elektronját egy réztartalmú plasztocianin (PC) komponens veszi át, amely az elektront a P_{700}^+ -hoz szállítja. Az akceptor oldalon A_0 -ról az elektron egy valószínűleg fillokinon molekulára, A_1 -re kerül. Innen vas-kén centrumokon (F_X , F_B , F_A) keresztül végül egy ferredoxin (Fd) molekulára jut (összefoglalásként ld. Demeter és Govindjee, 1989). A keletkező redukált ferredoxin a ferredoxin-NADP⁺ reduktáz (FNR) katalizálta reakcióban a NADP⁺-t redukálja.

A fentiekben leírtak, a víztől a NADPH⁺ felé irányuló elektronáramlás a fotoszintetikus elektrontranszportlánc ún. nem ciklikus működési módja. Emellett léteznek ciklikus elektrontranszport folyamatok is, melyek a fotoszintézis fiziológiai szabályozásában vesznek részt.

2.2. Az PSII fehérje szerkezete

Az 1980-as évek egyik igen nagy érdeklődéssel tanulmányozott fehérje komplexe a magasabb rendű fotoszintetizáló szervezetek tilakoid membránjába ágyazódott víz-plasztokinon oxidoreduktáz komplex, a második fotokémiai rendszer volt. Felépítésére vonatkozó jelenlegi ismereteink összefoglalását a 2. ábra mutatja. A PSII egy legalább 20 különböző polipeptidből álló multiprotein komplex - ideértve a katalitikus, a szabályozó és a szerkezeti alegységeket ill. néhány klorofill kötő proteint is (összefoglalásként ld. Andersson és Styring, 1991). Ezek az alegységek részben sejtmagban, részben kloroplasztisban kódoltak. A fotoszintetikus bíbor baktériumok röntgenkristallográfiás módszerrel pontosan leírt szerkezetű

reakciócentrumának (Michel és Deisenhofer, 1986) L és M alegységével való analógia alapján ma már általánosan elfogadott, hogy a PSII reakciócentrumok vázát a D1 és D2 proteinekből álló heterodimer alkotja (Nanba és Satoh, 1987). Mindkét protein molekulatömege 32 kDa és mindkettő kloroplasztiszban kódolt: a D1 protein a kloroplasztisz DNS *psbA* génjének terméke (Mattoo és mtsai, 1981), a D2 pedig a *psbD* gén terméke (Rochaix és mtsai, 1984). Közös tulajdonságuk továbbá, hogy aminosav szekvenciájuk igen jól konzervált (Erickson és mtsai, 1985; Svensson és mtsai, 1990). Az L és M alegységekkel valamint az egymással való homológia alapján modellezhető a D1, D2 proteinek harmadlagos szerkezete, amit a membránt átszelő öt hélix (A-E) valamint egy hatodik (CD), a membrán síkjával párhuzamos hélix alkot (Svensson és mtsai, 1990).

A PSII elektrontranszportjában résztvevő összes redox komponens hordozója a D1 és D2 protein. Az elsődleges töltésszétválasztásban résztvevő fotokémiaiilag aktív P680 klorofill a D1 és D2 protein 198-as hisztidinjéhez kötődik (Trebst, 1986), míg a feofitin molekula valószínűleg a D1 protein 130-as pozíciójú glutamin aminosavához (Moenne-Loccoz és mtsai, 1989). A PSII redukáló oldalán a töltés-stabilizációban szerepet játszó Q_A elsődleges és Q_B másodlagos kinon akceptorok rendre a D2 és D1 proteinek D és E héliceit összekötő szakaszához kapcsolódnak. Ez a feltevés a D1/D2 heterodimer és a bakteriális reakciócentrum közötti analógián alapul. A Q_B másodlagos akceptor esetében ezt az a kísérleti bizonyíték támasztja alá, mely szerint a Q_B helyére kötődő herbicidekkel szemben rezisztens mutánsokban a fenti D1 protein szakasz aminosav sorrendjében találhatóak a szenzitív vad típusétól való eltérések (Trebst, 1986). A PSII donor oldalán az elektrontranszportban a Z másodlagos donor szerepét betöltő komponens a D1 protein 161-es tirozinja (Tir-Z), míg a – bizonyos körülmények között szintén donorként szereplő – D donor a D2 ugyancsak 161-es tirozinja (Tir-D) (Debus és mtsai, 1988a,b; Vermaas és mtsai, 1988; Metz és mtsai, 1989). A vízbontó komplexben funkcionáló Mn csoport kötőhelye Svensson és munkatársai (1990) szerint a D1 protein A és B hélixét összekötő szakasza a tilakoid membrán belső oldalán.

A citokróm *b*-559 a PSII reakciócentrumhoz szorosan kapcsolódó fehérje (Cramer és Whitmarsh, 1977), melynek szerepe a fokozódó tudományos erőfeszítések ellenére sem tisztázott. Azt már sikerült megállapítani, hogy a citokróm *b*-559 nem vesz részt a PSII fő elektrontranszportjában. Funkciója azonban csak bizonyos körülmények között ismert. A vízbontó komplex gátlása esetén (pl. alacsony hőmérsékleten) a P_{680}^+ fotooxidálja a citokróm *b*-559-et (Vermeiglio és Mathis, 1973). Emellett arra is találunk utalást az irodalomban, hogy a PSII körüli ciklikus elektrontranszportban vesz részt (Mende és Wiessner, 1983). A citokróm *b*-559 különböző redox potenciálú formában lehet jelen. A magas potenciálú forma

(+350 mV) a friss preparátumokban számottevő, ezt tekintik az aktív formának. Az alacsony potenciálú forma (több ilyen forma létét is feltételezik, 5-230 mV közötti potenciállal) megzavart működésű vízbontó rendszer (pl. a perifériális proteinek eltávolítása, hőkezelés, öregedés stb.) mellett jut szerephez. A citokróm *b*-559 funkciójának részleges ismeretével ellentétben a szerkezete már kielégítően feltárt. A citokróm *b*-559 egy heterodimer, melyben a hisztidinekhez kapcsolódó redox aktív hem csoport a két hidrofób hélix közé ékelődik (Cramer és mtsai, 1990).

A magasabb rendű növények és eukarióta algák második fotokémiai rendszerében a tilakoid membrán belső felületén három sejtmagban kódolt vízdoldékony protein található (Murata és Miyao, 1985; Andersson és Akerlund, 1987), melyeket az irodalom molekulatömegük után 33 kDa-os, 23 kDa-os és 16 kDa-os fehérjeként tárgyal. Kísérleti eredmények alapján valószínűnek tűnik, hogy a két kisebb molekulású fehérje a Ca^{2+} és Cl^{-} ionok szerepét szabályozza a Mn csoport környezetében (Murata és Miyao, 1985; Andersson és Akerlund, 1987). A 33 kDa-os perifériális fehérje minden oxigént fejlesztő fotoszintetikus szervezetben megtalálható, így a cianobaktériumokban is. Ezt a proteint korábban a Mn kötési helyeként valószínűsítették (Murata és mtsai, 1983; Abramowicz és Dismukes, 1984). Újabb vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a 33 kDa-os protein nem mangánkötő, hiszen a Mn ionok kötötten tarthatók azután is, hogy a fehérjét eltávolították a membránból (Miyao és Murata, 1985; Ono és Inoue, 1984). A 33 kDa-os fehérje hiánya részben pótolható igen magas, nem fiziológias szintű Ca^{2+} és Cl^{-} tartalommal, ilyen körülmények között is van megfigyelhető oxigén fejlődés, bár erősen eltorzult kinetikával (Ono és Inoue, 1984; Miyao és mtsai, 1987). Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a 33 kDa-os protein szerepe struktúrális, a fehérje a Mn komplex helyes konformációjának stabilan tartásához szükséges (Ono és Inoue, 1984).

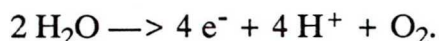
2.3. A fotoszintetikus oxigénfejlődés

Joseph Priestly már 1776-ban megállapította, hogy a növények "képesek javítani a levegő minőségén", azaz oxigént termelni. Azóta igen sokan szentelték figyelmüket a fotoszintetikus oxigénfejlődés témakörének, de néhány alapvető kérdés még ma sem tisztázott.

Biztosan tudjuk, hogy a fotoszintézis során felszabaduló oxigén a vízből és nem a szén-dioxidból származik. Ezen állítás legmeggyőzőbb bizonyítékát tömegspektrometriás kísérletek szolgáltatták, melyek során Ruben és mtsai (1941) a ^{18}O izotópot használták jelölőként. A *Chlorella* sejtek által felszabadított oxigén izotópösszetétele megfelelt a vízben lévő ^{16}O : ^{18}O aránynak és független volt a

bikarbonát formájában adagolt szén-dioxid ^{18}O izotópszintjétől. Közel 20 évvel később azonban megkérdőjelezték a fenti eredmények helyességét a gyors izotópkicserélődési reakciók lehetősége miatt a víz-bikarbonát keverékben (Warburg és Krippahl, 1960). A kísérleti körülmények gondos megválasztásával azonban minimálissá tehető ez a hibaforrás. Stemler és Radmer (1975) majd Radmer és Ollinger (1980) által végzett ^{18}O izotópos mérések eredményei megerősítették a fotoszintetikus oxigén vízből való eredetét.

A természetben a második fotokémiai rendszer kizárólagos képessége a víz elbontása elektronokká, protonokká és molekuláris oxigénné. Egy oxigén molekula felszabadításához négy elektront kell elvonni két molekula vízből:



A PSII reakciócentrum klorofillja egy foton elnyelésével egyetlen töltésszétválasztást tud csak generálni. A sikeres vízbontáshoz azonban egyszerre négy pozitív töltés szükséges. Ez azt jelenti, hogy a PSII elektrontranszport láncában kell lennie egy négyelektronos kapunak, mely csak négy töltés egyidejű jelenlétében nyílik meg. Ezen töltéstároló rendszer mibenléte, működése még ma is a fotoszintézis kutatás egyik nagy rejtélye.

Ismereteink elsősorban az oxigénfejlődés kinetikai modelljére vonatkoznak (összefoglalásként ld. Szalay és Lehoczki, 1979; Hansson és Wydryzynski, 1990). A kinetikai vizsgálatok lényege, hogy a sötétadaptált fotoszintetikus mintát néhány Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozattal világítják meg. A fényimpulzusok intenzitása a fotoszintézis szempontjából telítési kell legyen, azaz elegendő ahhoz, hogy minden reakciócentrumban beinduljanak a fotokémiai reakciók. A fényimpulzusok időtartama pedig olyan rövid kell legyen (néhányszor 10^{-6} s), hogy minden reakciócentrumban csak egy töltésszétválasztást generáljon. Az ilyen fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés jellegzetes négyes periódusú oszcillációt mutat. Az első fényimpulzusra nem termelődik oxigén, a másodikra is csak kevés. Az első oxigénmaximum a harmadik impulzusnál jelentkezik. Az itt fejlődött oxigén mennyisége akár két-, háromszorosa is lehet az ugyanilyen intenzitású folytonos megvilágításkor kapott értéknek. További maximumok a hetedik, tizenegyedik stb. fényimpulzusoknál találhatók, miközben az oszcilláció csillapodik és az oxigénfejlődés mindinkább megközelíti a folytonos megvilágításkor mért értéket, az ún. "steady-state"-et. A továbbiakban a fényimpulzusszám függvényében felrajzolt relatív oxigén értékek összességét oxigén szekvenciának fogjuk nevezni.

A fenti kísérletet először Pierre Joliot és Anne Joliot végezte el 1968-ban. Azóta több elmélet született a csillapodó oszcilláció értelmezésére, melyek közül leginkább elfogadott Kok és munkatársai által 1970-ben felállított modell.

2.4. A Kok modell

Az 2. ábra alsó inzertjén látható Kok modell szerint a vízbontó enzim öt különböző oxidációs állapotban lehet, melyeket S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 -gyel jelölünk. Ezen állapotok a proteinhez kötött 4 Mn atom különböző vegyértékállapotainak felelnek meg. A reakciócentrumban végbemenő fényindukált töltésszétválasztást követően a vízbontó enzim egy elektront ad át a Tir-Z másodlagos donornak, ami által a vízbontó enzim magasabb oxidációs állapotba kerül. A fényindukált átmenet az $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ és az $S_3 \rightarrow S_4$ átmenet. Ezek közül az első kettő kb. 0.4 ms, a harmadik 0.1 ms félidejű folyamat (Bouges-Bocquet, 1973). Az S_4 állapot instabil, a molekuláris oxigén felszabadulása az $S_4 \rightarrow S_0$ sötétben lejátszódó átmenet során valósul meg. Az $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ átmenet félideje nagyobb mint az előzőké (Sinclair és Arnason, 1974, $t_{1/2}=2.31$ ms; Bouges-Bocquet, 1973, $t_{1/2}=1.19$ ms).

A négyes periódusú csillapodó oszcilláció értelmezéséhez további feltételezések szükségesek (Joliot és Kok, 1975):

- Minden PSII reakciócentrum a hozzá tartozó vízbontó enzimmal egymástól függetlenül működik, azaz közöttük pozitív töltés vagy oxidáló ekvivalens kicserélődés nincs.
- Az enzimciklus lépéseire tartozó fotokémiai reakciók mindegyike azonos határfokú egykvantumozott folyamat.
- Az S_0 és az S_1 állapot sötétben stabil. Az S_2 , S_3 állapotok sötétben az S_1 állapotba alakulnak vissza néhány száz másodperces félidejűvel. Így a kb. 3-5 perc időtartamú sötétadaptálás végén az egyes állapotok gyakorisága $S_0:S_1:S_2:S_3=0.25:0.75:0.00:0.00$. A túlsúlyban lévő S_1 állapotból három egymást követő fényimpulzus juttatja a centrumokat az oxigénkibocsátást eredményező S_4 állapotba, ezért látjuk az első oxigénmaximumot a harmadik fényimpulzus után.
- Az oszcilláció csillapodásának értelmezésére az S állapotok közötti átmenetek három fajtáját vezették be. Ezek – az angol irodalomban elterjedt kifejezéseket használva – a "miss", a "single hit" és a "double hit", amelyek rendre a vízbontó enzim 0, 1 ill. 2-vel magasabb oxidációs állapotba való kerülését jelentik egy fényimpulzus után. Ez vezet a kiinduló állapotok egyensúlyának megbomlásához és végül az oszcilláció megszűnéséhez. Jelöljük α , β , γ -val a "miss", "single hit", "double hit" gyakoriságát és $S_n^{(i)}$ -vel az i -edik fényimpulzus után egy adott S állapotot. Ekkor α az $S_n^{(i)} \rightarrow S_n^{(i+1)}$, β az $S_n^{(i)} \rightarrow S_{n+1}^{(i+1)}$ és γ pedig az $S_n^{(i)} \rightarrow S_{n+2}^{(i+1)}$ átmenet gyakorisága. A "double hit" eredményezi a fent említettek mellett az oxigén felszabadulását már a második fényimpulzus után, a "miss" pedig azt, hogy az oxigénmaximumok eltolódnak a négyes periodicitáshoz képest (a hetedik ill.

tizenegyedik stb. fényimpulzusok helyett a nyolcadik ill. tizenkettedik esetleg tizenharmadik stb. fényimpulzusokra). A "miss" értéke magasabb rendű növények jó minőségű izolált kloroplasztiszában $\alpha \approx 0.1$, intakt algáknál $\alpha \approx 0.2$, a "double hit" értéke kb. 0.03-0.05.

Ha vizsgálandó mintát közvetlenül a fényimpulzus sorozattal történő gerjesztés előtt rövid ideig folyamatos fénnel elővilágítjuk, azt tapasztaljuk, hogy az oxigénfejlődésben az oszcilláció mélysége nagyon kicsi (5%) (Joliot és mtsai, 1969). Ez azt jelenti, hogy "steady state" esetén a centrumok egyenletesen oszlanak meg az egyes állapotok között, azaz $S_0:S_1:S_2:S_3=0.25:0.25:0.25:0.25$. Az S_4 állapot koncentrációja elhanyagolható, mert az S_4 állapot oxigénkibocsátás közben igen gyorsan S_0 állapotba alakul vissza. Ezek alapján Joliot arra a következtetésre jutott, hogy az oxigéntermelés minden lépése azonos kvantumhatásfokú kell, hogy legyen.

Ha a mintát gyenge, nem telítési intenzitású fényimpulzusokkal világítjuk meg, azt tapasztaljuk, hogy a fejlődő oxigén mennyisége lineárisan függ a fényintenzitástól (Kok és mtsai, 1970). Mivel az egyes impulzusok után fejlődött oxigén mennyisége az oxigénfelszabadítást eredményező állapotról ad közvetlen információt, Kok arra a megállapításra jutott, hogy ez a lépés ($S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$) egykvantumós folyamat. Így, figyelembe véve Joliot eredményeit is, az oxigénfejlődés minden lépése egykvantumós folyamatnak tekinthető (Wydrzynski, 1982).

Az a tény, hogy a felszabaduló oxigén mennyisége oszcillációt mutat, arra utal, hogy minden oxigénfejlesztő rendszer a szomszédaitól függetlenül működik. Ezt azok a megfigyelések is alátámasztják, melyek szerint az oxigénfejlesztésre képes centrumok számának csökkenése nincs hatással az oxigén szekvencia alakjára. Ezekben a kísérletekben DCMU-val, (az elektrontranszportot a Q_A elsődleges akceptor és a Q_B másodlagos akceptor között gátló vegyi anyaggal) történő kezelés, UV besugárzás, vagy a Mn elvonása után – mindegyik eljárás az aktív oxigénfejlesztő centrumok számát csökkenti, – a fent leírtakat tapasztalták (Kok és mtsai, 1970). Ezen kezelések mellett minden fényimpulzus után hasonló mértékű volt a gátlás, még akkor is, ha az amplitúdók több mint tizedrészére csökkentek a kontroll értéknek.

Az oszcilláció csillapodásának értelmezésére bevezetett "miss" ill. "double hit" paraméterek fizikai, kémiai háttere még nem ismert.

Kezdetben feltételezték, hogy a "double hit" oka a túl hosszú fényimpulzus. Ha a fényimpulzus alatt a fény intenzitása csak lassan csökken le (hosszú az impulzus lefutása), akkor ez alatt az idő alatt két átfordulás történhet $S_n^{(i)} \rightarrow S_{n+2}^{(i+1)}$ (Wydrzynski és Sauer, 1980). Ennek ellentmond az, hogy frissen izolált kloroplasztiszokat nagyon rövid, 5 ns-os lézerimpulzusokkal 500 ns időközökkel megvilágítva is szignifikáns oxigénmennyiség jelentkezett a második impulzus után (Jursinic, 1981). Ez azonban eltűnt, ha a mintát szobahőmérsékleten vagy hűtve

tárolás után vizsgálták. Ezen eredmények magyarázata céljából Jursinic a "double hit" két típusát különbözteti meg: a nem fotokémiai típusút, amely az PSII belső tulajdonsága, és a fotokémiai típusút, amely függ az PSII-beli sebességi állandóktól és így a gerjesztő impulzusok időbeli szerkezetétől.

A "miss"-t, azaz az $S_n^{(i)} \rightarrow S_n^{(i+1)}$ átmenetet is alapvetően kétféleképpen értelmezhetjük (Wydrzynski, 1982): az egyik esetben nem történik töltésszétválasztás a reakciócentrumban, a másik esetben pedig megtörténik a töltésszétválasztás, de a töltés elvész az oxigénfejlődés számára. Az első feltételezésnek egyelőre még nincs meggyőző kísérleti bizonyítéka. Ugyanis az elsődleges donor ill. akceptor komponensek reakcióidője sokkal rövidebbek, mint az egyes fényimpulzusok között általában alkalmazott 1-2 szekundumos időtartam, így igen valószínűtlen, hogy a centrumok "zártak" legyenek a következő impulzus érkezésekor. A töltésszétválasztás azonban elmaradhat amiatt is, hogy a reakciócentrum nincs összekapcsolódva a fénybegyűjtő rendszerrel, vagy hogy valamilyen deaktivációs folyamat sikerrel kel versenyre az elsődleges fotokémiai reakciókkal (Wydrzynski, 1982). A második feltételezés pl. töltésrekombináció útján valósulhat meg. Ennek során bizonyos centrumokban a fénykvantum energiája nem stabilizálódik az S állapotokat is érintő töltésszétválasztásban, hanem lumineszcenciaként kisugárzódik. A fotoszintetikus rendszerekben megfigyelt mikroszekundumos Chl lumineszcenciát a $P680^+$ és Q_A^- közötti töltésrekombináció eredményeként értelmezik. A lumineszcencia nagysága azonban igen kicsi az általában megfigyelhető "miss" értékek (10-15%) kielégítő magyarázatára. Így lehetséges, hogy a töltésrekombinációval előállott magasabb energiájú állapot nem lumineszcencia fény kibocsátásával, hanem valamilyen más disszipatív folyamat által szűnik meg (Wydrzynski, 1982).

Az első oxigén szekvenciák analízisének (Forbush és mtsai, 1971) feltételezték, hogy a "miss" paraméter ugyanakkora a különböző átmeneteknél. Mátrix formalizmus felhasználásával Delrieu (1974) olyan analízist végzett, amelyben 0-nak tekintette a "miss" paraméter értékét az $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ átmenetre, és igen nagy az $S_2 \rightarrow S_3$ ($\alpha = 0.542$) ill. az $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ ($\alpha = 0.20$) átmenetre. Ezzel az analízissel jobb eredményt kapott, mint az egyenletes eloszlású "miss" paraméter feltételezésével.

Delrieu analízisét Lavorel általánosította (1976). Az általa bevezetett mátrix formalizmussal az egyes S állapotok koncentrációját az i-edik fényimpulzus után a következőképpen írhatjuk le:

$$S^{(i)} = K S^{(i-1)}$$

ahol $S^{(i)}$ az $\{S_0^{(i)}, S_1^{(i)}, S_2^{(i)}, S_3^{(i)}\}$ állapotokból álló oszlopvektor, K az átmeneti mátrix.

$$\mathbf{K} = \begin{bmatrix} \alpha_0 & 0 & \gamma_2 & \beta_3 \\ \beta_0 & \alpha_1 & 0 & \gamma_3 \\ \gamma_0 & \beta_1 & \alpha_2 & 0 \\ 0 & \gamma_1 & \beta_2 & \alpha_3 \end{bmatrix}$$

Ha a teljes reakciócentrumszám 1-re normált, akkor minden i -re fenáll a következő összefüggés:

$$\sum_{n=0}^3 S_n^{(i)} = 1.$$

Lavorel megállapította, ha minden átmenetre különböző paraméter értékeket feltételezünk, akkor a rendszer matematikailag határozatlanná válik, azaz lehetetlen lesz az egyes paraméterek kiszámítása. Ezért a modell további egyszerűsítő feltevése, hogy a "miss", "single hit", "double hit" értékek ugyanakkorák különböző átmeneteknél, azaz minden n -re ($n=0,1,2,3$):

$$\alpha_n = \alpha, \beta_n = \beta, \gamma_n = \gamma.$$

Az oxigén szekvenciák értékelésénél kezdetben mi is ezt a modellt használtuk. Alkalmazásával a számítógépes görbeillesztés eredményeként megkapjuk az S_0 , S_1 állapot kezdeti eloszlását, valamint az α , β , γ paramétereket.

Ha a "miss" teljes egészében fotokémiai eredetű lenne, akkor a "miss" arányának a növekedésével a "steady state"-nek szükségszerűen csökkenie kellene. Ezzel szemben, annak ellenére hogy az algáknál a kvantumhatásfok nagyobb mint a magasabb rendűek kloroplasztisznál, algák esetében az oszcilláció csillapodása mégis nagyobb mértékű ($\alpha \approx 0.2$) mint izolált kloroplasztiszbán ($\alpha \approx 0.1$). Ezért vannak olyan feltételezések, melyek szerint léteznek nem kötött, valamilyen mozgásra képes töltéshordozók, melyek képesek a pozitív töltés elvételére valamely S állapottól, és így "miss" faktor előidézésére.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a "miss", "double hit" paraméterek pontos eredete, mibenléte még nem ismert.

Az eredeti Kok modell szerint két vízmolekula oxidálódásakor egy oxigénmolekula és $4 H^+$ egyszerre szabadul fel az $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ átmenet során. A proton-felszabadulás vizsgálatára irányuló kísérletek azonban a fentieket nem igazolták. Hosszú ideig széles körben elfogadott eredmény volt, hogy az $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ és az $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ átmenet során rendre 1, 0, 1, 2 proton szabadul fel (Fowler, 1977; Saphon és Crofts, 1977; Förster és mtsai, 1981). A legújabb adatok szerint ezek a sztöhiometriai együtthatók nem egész számok és értékük pH-függést mutat (Rappaport és Lavergne, 1991).

2.5. Az S_0 állapot stabilitása

A Kok modell szerint sötétben az S_0 , S_1 állapotok stabilak, míg az S_2 , S_3 állapotok nem. Igen sok (50) fényimpulzussal vagy folyamatos fénnel történő megvilágítás után az egyes állapotok egyenletesen oszlanak meg a centrumok között. A megvilágítást követő sötétadaptálás alatt az S_2 , S_3 állapotok az S_1 állapotba alakulnak vissza, így a centrumok 25%-a S_0 , 75%-a S_1 állapotban van.

Az S_0 , S_1 állapotok közötti egyensúlyt vizsgálta Bouges-Bocquet (1973) oxigén szekvenciák analízisével. Megmutatta, hogy kémiai módszerekkel az $S_0:S_1=0.25:0.75$ arány mindkét irányba eltolható. Ferricianid (erős oxidálószer) jelenlétében a centrumok mindegyike S_1 állapotba kerül ($S_0:S_1=0.00:1.00$), míg redukált DCPIP-val történő inkubálás után az $S_0:S_1$ arány az S_0 felé tolódott ($S_0:S_1=0.50:0.50$). Ez utóbbi eredményt Bouges-Bocquet úgy értelmezte, hogy a kezelés hatására bizonyos mértékben lejátszódott az $S_1 \rightarrow S_0$ reakció. Velthuys és Visser (1975) ESR mérések eredményei alapján ezt a magyarázatot nem találták helytállónak. Ők azt feltételezték, hogy sötétben a centrumok mindegyike S_1 állapotba kerül, és a redukált DCPIP hatására bekövetkező változást azzal értelmezték, hogy a pozitív töltés elvész valahol, s ez okozza a látszólagos S_0 populációt.

Vermaas és munkatársai (1984) különböző frekvenciájú fényimpulzus sorozat hatására kialakuló oxigén szekvenciákat tanulmányoztak. Azt tapasztalták, hogy a Kok modellből meghatározott S_0 mennyisége függ a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciájától. Sötétadaptálás után az S_0 mennyisége 4 Hz frekvencia mellett közel 0%, míg 0.5 Hz frekvencia esetén kb. 20% volt. Ez az eredmény ellentmond egy valóban létező S_0 populáció feltételezésének, mivel ennek mennyisége nem függhet ettől a frekvenciától. Emellett megmérték azt is, hogy az S_2 , S_3 állapot lecsengésének van egy kb. 20%-os amplitúdójú gyors fázisa. Ezen eredmények alapján arra következtettek, hogy sötétadaptálás után minden centrum S_1 állapotban van, s hogy a látszólagos, frekvenciafüggő S_0 populációt valamint az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a gyors fázist egy aktív donortól történő egyszeri elektronátadás eredményezi a centrumok kb. 20%-ában. Egyszeri elektronátadást feltételeztek, mert egyébként a frekvencia csökkenésével a "miss" paraméternek nőnie kellene, de ezt nem tapasztalták. Másfelől Styring és Rutherford (1987) ESR mérések alapján megállapították, hogy rövid ideig tartó sötétadaptálás után a centrumok 25%-a ténylegesen S_0 állapotban van. Ez az állapot a hosszú ideig tartó sötétadaptálás során S_1 állapotba konvertálódik, amivel együtt jár a második fotokémiai rendszer Tir-D donorjának (ld. 2. ábrát) redukálódása ($S_0D^+ \rightarrow S_1D$). A Tir-D oxidált formájából egy karakterisztikus, hosszú élettartamú ESR jel ered, az ún. Signal II_{slow}. A Tir-D donor szerepe még ma sem ismert kielégítően.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az oxigénfejlesztő fotoszintetizáló szervezetek lényeges funkciója a víz elbontása elektronokká, protonokká és molekuláris oxigénné. E komplex folyamat több lépése ma már ismert, de ahhoz, hogy részleteiben és egészében egyaránt feltáruljon előttünk még sok megoldatlan kérdés megválaszolása szükséges.

Munkánkban célul tűztük ki, hogy:

- megvizsgáljuk az S_0 állapot stabilitását.
- megvizsgáljuk milyen összefüggésben van a látszólagos, frekvenciafüggő S_0 populáció megjelenése az S_2 , S_3 állapot lecsengésében jelentkező gyors fázissal.
- gyors és olcsó tesztelő módszert dolgozunk ki a Tir-D redox állapotának meghatározására.
- módosítjuk a Kok modellt a Tir-D donor redox reakcióinak beépítésével.
- megvizsgáljuk a Tir-D redox állapotának változását a -70°C hőmérsékletű sötétadaptálás folyamán.
- megmérjük az S_2 , S_3 állapot lecsengésének hőmérséklettől való függését.
- megvizsgáljuk a 33 kDa-os perifériális protein szerepét az *in vivo* vízbontásban.
- tanulmányozzuk zöld algákban a fotoheterotróf nevelési körülmények hatását az oxigénfejlődésre.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A minták előkészítése

4.1.1. Tilakoid membrán izolálása

A kísérleteinkhez szükséges tilakoid membránt üvegházi vagy piaci spenótból izoláltuk. A spenót leveleit kisebb darabokra téptük. A levéldarabkákhöz izoláló puffert (50 mM MES pH 6.5, 400 mM szorbit, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM Na-aszkorbát, 0.4% BSA) adtunk, turmix gépben összetörtük, majd kétrétegű nylon szűrőn (pórusméret kb. 30 µm) leszűrtük. A szűrletben maradt sejttörmelékét centrifugálással távolítottuk el (2000 g, 5 perc). Végül az üledéket jégben hűtött szuszpendáló pufferben vettük fel (50 mM HEPES pH 7.5, 400 mM szorbit, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA). A tilakoid szuszpenziót Eppendorf csövekbe osztottuk szét (0.5-1.0 ml/cső) és mérésig -70°C-on tároltuk. A klorofill koncentrációt Arnon módszerével (Arnon, 1949) határoztuk meg SHIMADZU UV-160 spektrofotométer segítségével.

A DCPIP-vel valamint aszkorbáttal történő kezelésnél ezen anyagokat a megfelelő koncentrációban (0.075 mM DPCIP, 0.75 mM Na-aszkorbát) csak közvetlenül a mérés előtt adtuk a tilakoid szuszpenzióhoz.

4.1.2. A *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium nevelése

A kísérletekben használt *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium a *Synechocystis* 6803-G glükózt hasznosító törzse (Williams, 1988). A sejteket steril Erlenmeyer lombikban 5% CO₂ tartalmú levegő átbuborékolatása mellett, 5 mM glükózt tartalmazó BG-11 tápoldatban (Rippka és mtsai, 1979) 28-31°C hőmérsékleten neveltük. Szilárd táptalajon a Pakrasi és munkatársai (1988) által leírt módszer szerint tartottuk fenn a kultúrákat. A mérésekhez a sejteket növekedésük exponenciális szakaszában ($A_{730\text{ nm}} \approx 0.6-0.8$) centrifugálással (4000 g, 10 perc) gyűjtöttük be. A Chl *a* koncentrációját metanolos kivonással MacKinney (1941) által meghatározott extinkciós együtthatóval határoztuk meg.

A 33 kDa-os perifériális proteint kódoló *psbO* gén-hiányos IC2 mutánst (Mayes és mtsai, 1991) szintén BG-11 táptalajon tenyésztettük 5 mM glükóz és 25 µg/ml kanamicin hozzáadásával – ez utóbbit a mutánsok felülfertőződésének elkerülése céljából.

4.1.3. A *Chlamydotrys stellata* és *Chlamydomonas reinhardtii* algák nevelése

A *Chlamydotrys stellata* obligát fototróf zöld alga 10-1e jelű törzsét a göttingeni törzsgyűjteményből kaptuk (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut, Universität Göttingen). A sejteket folyamatos 15 W/m² intenzitású fehér fényű megvilágítás mellett neveltük 30°C hőmérsékleten, autotróf módon 5% CO₂ tartalmú levegő jelenlétében, fotoheterotróf módon szénforrásként 10 mM végkoncentrációban Na-acetátot adva a tápoldathoz (Wiessner, 1968). A *Chlamydomonas reinhardtii* sejteket a Kuhl-féle tápoldatban (Kuhl, 1962) a fentiekkel azonos körülmények között neveltük. Az oxigén fejlődés méréséhez a sejteket centrifugálással gyűjtöttük be (4000 g, 3 perc), majd az üledéket 50 mM KCl-ot tartalmazó 50 mM foszfát pufferben (pH 6.5) szuszpendáltuk fel. Az oxigén méréseket minden esetben egész sejteken végeztük 10 perccel az algák begyűjtése után.

4.2. A Joliot típusú oxigén elektród és a hozzá kapcsolódó mérőberendezés leírása

A vízbontási folyamat részleteinek kvantitatív vizsgálatára igen fontos módszer a kibocsátott oxigén gyors polarográfiás vizsgálata. Ezt teszi lehetővé a gyors oxigén polarográf, más néven Joliot elektród. Ez a módszer házilag készített műszerekkel nagyságrendekkel olcsóbban valósítható meg, mint a hasonló célokra alkalmazható gyors optikai mérőmódszerek, mélyhőmérsékletű ESR vagy NMR. Az intézetünkben megépített oxigén elektród irodalmi forrásaként Joliot (1972) valamint Maróti és munkatársainak (1984) a közleménye szolgált.

A Joliot elektród egy Pt katódot és egy Ag anódot tartalmaz. A Pt elektród 0.6-0.7 V negatív potenciálú az Ag/AgCl referencia elektródhoz viszonyítva. A Pt elektród egy kb. 5 mm átmérőjű körlap. Az erre helyezett 10 µl tilakoid szuszpenziót egy féligáteresztő és fényáteresztő celofán membrán választja el a KCl-ot tartalmazó vezető puffertől valamint a kb. 15 mm átmérőjű és kb. 2 mm szélességű körgyűrű alakú Ag elektródtól. A KCl biztosítja a puffer elegendően nagy vezetőképességét. A vezető pufferoldatot egy perisztaltikus pumpa segítségével áramoltatjuk. A cellát egy kvarc ablak zárja le, ezen keresztül világítjuk meg a mintát. A megvilágítás hatására fejlődő oxigén a Pt elektródhoz diffundál és ott elektromos jelet hoz létre.

A Joliot elektródon elhelyezett mintát gyors lefutású fényimpulzusokkal világítjuk meg. Erre a célra egy Xenon villanó lámpát használunk (General Radio, Stroboslave 3 µs, 0.5 J). A fényimpulzusok hatására fejlődő oxigénmennyiséggel arányos elektromos jelet először egy házilag épített erősítővel erősítjük, majd az erősítőtől párhuzamosan kerül a jel egy sokcsatornás analizátorba (KFKI, ICA-70)

illetve egy oszcilloszkópba (TR 4655/2). A mérés vezérlését, az adatok tárolását és előzetes analizisét egy C-64 számítógép végzi. A további feldolgozást IBM AT kompatibilis számítógép teszi lehetővé. Ennek segítségével a bevezetőben leírt Kok modell paramétereit határozzuk meg egy, a legkisebb négyzetek elvén működő simplex görbeillesztési eljárással, mely minimalizálja a kísérleti és elméleti oxigén szekvenciák különbségének négyzetösszegét. Az elméleti oxigén szekvenciákat az eredeti Kok modellen ill. a Tir-D donor redox reakcióit is figyelembe vevő változatán alapuló, az S állapotok átmenetét leíró mátrix formalizmus (Delrieau, 1974; Lavorel, 1976) segítségével számítottuk ki.

4.3. A fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés mérése

A fényimpulzusokkal indukált oxigén mérésekhez a -70°C -ról elővett tilakoid szuszpenziót először $750\text{--}1000\text{ }\mu\text{g Chl/ml}$ koncentrációra hígítottuk, majd $30\text{--}50\text{ }\mu\text{l}$ mennyiségekre osztva -30°C -on tároltuk a mérés kezdetéig. A mintákat egyesével, közvetlenül az oxigén szekvencia mérése előtt melegítettük fel szobahőmérsékletre, majd általában 3 perc sötétadaptálási idő után mértük a meghatározott frekvenciával adott fényimpulzus sorozat hatására fejlődő oxigénmennyiséget. A sötétadaptálás megkezdése előtt, amikor ezt az eredmények leírásakor jeleztük, a mintákat folyamatos fényvel vagy fényimpulzus sorozattal elővilágítottuk.

Az S_0 mennyiségének, valamint az S_2 és az S_3 állapot gyors fázisának a sötétadaptálási idővel történő változás mérésekor a tilakoid szuszpenziót Petri csészébe helyeztük, egy 650 W -os NARVA halogén lámpával 1 percig megvilágítottuk, a mérési céltól függően különböző ideig sötétadaptáltuk, gyenge zöld fényben $30\text{--}50\text{ }\mu\text{l}$ -ekre osztottuk, majd -30°C -on tároltuk. A megvilágítással az egyes méréseknél a PSII azonos kiindulási állapotát igyekeztük biztosítani, a különböző ideig tartó sötétadaptálással pedig az $S_0:S_1$ arányt változtattuk meg. Az oxigénfejlődést ezek után már további elővilágítás nélkül, 3 perc sötétadaptálás után mértük.

Az S_2 ill. S_3 állapot időbeli lecsengésének meghatározásakor Vermaas és munkatársai (1984) által leírtak alapján jártunk el. Az S_3 állapot esetén két 4 Hz frekvenciával adott, az S_2 állapot esetén pedig egy elővilágító fényimpulzust adtunk, vártunk bizonyos ideig ($0.1\text{--}300\text{ s}$), majd megmértük egy 10 fényimpulzusból álló sorozat hatására fejlődő oxigént. A mérő fényimpulzus sorozat frekvenciája minden esetben 4 Hz volt. Jelöljük Y_i -vel az i -edik impulzus után felszabaduló oxigén mennyiségét, $Y_{av,i-j}$ -vel az i -edikől a j -edik impulzusig terjedő oxigén értékek átlagát, Y_{2c} -vel pedig az elővilágítás nélküli oxigén szekvenciában az $Y_2/Y_{av,3-6}$ értéket. Ekkor $S_{2,rel} = Y_2/Y_{av,2-5} - Y_{2c}$ ill. $S_{3,rel} = Y_1/Y_{av,1-4}$ adja az S_2 ill. az S_3

relatív mennyiségét. Ezeket a mennyiségeket az elővilágítás és a 4 Hz-es fényimpulzus sorozat között eltelt idő függvényében ábrázolva kaptuk meg az S_2 , S_3 állapot időbeli lecsengését. A lecsengések komponensekre bontását a féllogaritmikus ábrázolásból végeztük a hosszabb időtartományok felől a rövidebbek felé haladva, az egyes komponensek lefutására exponenciális kinetikát feltételezve:

$$I = A \exp(-k t)$$

ahol A a komponens amplitúdója, t a lecsengési idő, $k = \ln 2/t_{1/2}$ a lecsengés $t_{1/2}$ félidejéből.

Az S_2 , S_3 relatív mennyiségét két exponenciális komponens összegeként kezeltük. Az egyes fázisok relatív amplitúdóját a komponensek amplitúdóinak arányából határoztuk meg.

Az S_2 ill. S_3 állapotok lecsengésével egyidőben történő S_1 ill. S_2 relatív mennyiségének változását a következő összefüggésekből számítottuk ki:

$$S_{1,rel} = (Y_3 - 2\alpha(Y_2 - \alpha Y_1)) / ((1 - \alpha)^2 Y_{av,2-5})$$

$$S_{2,rel} = Y_2 / Y_{1-4} - Y_{2c}$$

ahol α a "miss" faktor.

Az S_2 , S_3 lecsengés hőmérséklet függésének mérésekor a különböző hőmérsékletek előállításához termosztátot, víz-jég keverékét ill. olvadó jeget használtunk. A hőmérséklet meghatározásához közvetlenül a cella után, a kiáramló pufferoldat útjába egy házilag készített platina ellenállás hőmérőt iktattunk be, melynek érzékenysége 0.1°C volt.

A *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium fényimpulzusokkal gerjesztett oxigén fejlesztését a fentebb leírt elektróddal mértük $50 \mu\text{g Chl } a/\text{ml}$ koncentrációjú mintákon mesterséges elektron akceptorok hozzáadása nélkül. Az 50 fényimpulzusból álló elővilágítást 5 perc sötétadaptálás követte. Az oxigénfejlődést 1 Hz frekvenciájú fényimpulzusok sorozatával indukáltuk. Az adatok értékelése az előzőekben leírtak szerint történt.

A *Chlamydomonas stellata* és a *Chlamydomonas reinhardtii* algák oxigénfejlesztésének vizsgálatát a Göttingeni Egyetem Növényélettani Intézetében (Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen) végeztük. A fényimpulzusokkal indukált oxigén fejlődés méréséhez az előbbiekben leírt, de ahhoz képest módosított elektródot használtunk. A mérőcellában a Pt korongot a korong síkjában egy Ag gyűrű veszi körül. A cella membránt nem tartalmaz, a két elektród közötti elektromos vezetést a minta szuszpendáló oldatában lévő 50 mM KCl biztosítja. A $150 \mu\text{l}$ térfogatú, $50 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$ koncentrációjú mintákat 5 perc sötétadaptálás után fényimpulzusok sorozatával (TURO STROB, $1.5 \mu\text{s}$, 0.2 J) világítottuk meg. A fényimpulzus sorozat frekvenciája 4 Hz volt. Szükség esetén a DCQ-t 1 mM végkoncentrációban adtuk a mintához, majd az algasejteket először 5

percig fényen inkubáltuk, ezt követően pedig az elektród felületén 5 percig sötétadaptáltuk. A DCMU-t ($0.5 \mu\text{M}$) a sötétadaptálás előtt adtuk a mintához. A fényimpulzusok indukálta oxigénfejlődés adatainak feldolgozása ugyanúgy történt, mint a spenót tilakoidok esetében.

4.4. A folyamatos megvilágítással indukált oxigénfejlődés mérése

A *Clamydobotrys stellata*, *Chlamydomonas reinhardtii* és *Synechocystis* sp. PCC 6803 oxigénfejlesztő képességének meghatározása Clark típusú (Hansatech DW2) O_2 elektróddal történt folyamatos, telítési intenzitású megvilágítás mellett, állandó hőmérsékleten (25°C ill. 31°C). A méréseket nevelőoldatban lévő intakt sejteken végeztük, az algák esetében szükség szerint 1 mM DCQ és/vagy $0.5 \mu\text{M}$ DCMU, a cianobaktérium esetében pedig vagy 10 mM NaHCO_3 vagy 1 mM 2,5-dimetil-p-benzokinon és 1 mM kálium–ferricianid jelenlétében.

4.5. Az elekton spin rezonancia mérése

Az ESR méréseket a Stockholmi Egyetem Biokémiai Intézetében végeztük. A spenót tilakoidok X-sávú alacsony hőmérsékletű ESR spektrumát egy Oxford Instruments kriosztáttal és hőmérséklet szabályozóval felszerelt Bruker ESP 300 spektrométer segítségével vettük fel -158°C hőmérsékleten. Az ESR minták ($4\text{--}5 \text{ mg Chl/ml}$) alacsony hőmérsékleten történő megvilágítását egy nem beüzemelt Dewar edényben 1000 W -os vetítőlámpa segítségével végeztük. Azon célból, hogy a PSII centrumokban egyszeres stabil töltésszétválasztást hozzunk létre, a mintákat -75°C -on 4 percig világítottuk meg szilárd CO_2 /etanol keverékének felhasználásával. A citokróm *b*-559 fotooxidációjához 20 percig tartó megvilágítást alkalmaztunk -196°C -on. A mért ESR spektrumok kiértékelése – az alapvonal kivonás, a citokróm jelek integrálása – a spektrométer ESP 300 programjának segítségével történt.

4.6. Az abszorpció változás mérése

A spenót tilakoidok citokróm *b*-559-éhez kapcsolódó kémiai indukált abszorpció változásokat 559 és 570 nm között Aminco DW-2V ill. Shimadzu UV-3000 spektrofotométer kettős hullámhosszú mérési módjában rögzítettük. A citokróm *b*-559-et 1 mM kálium-ferricianiddal oxidáltuk, majd a magas és alacsony potenciálú formákat rendre 5 mM hidrokinnal és 4 mM Na aszkorbáttal redukáltuk. A redox vegyületeket sötétben adtuk a folyamatos kevert mintához a mérés megszakítása nélkül.



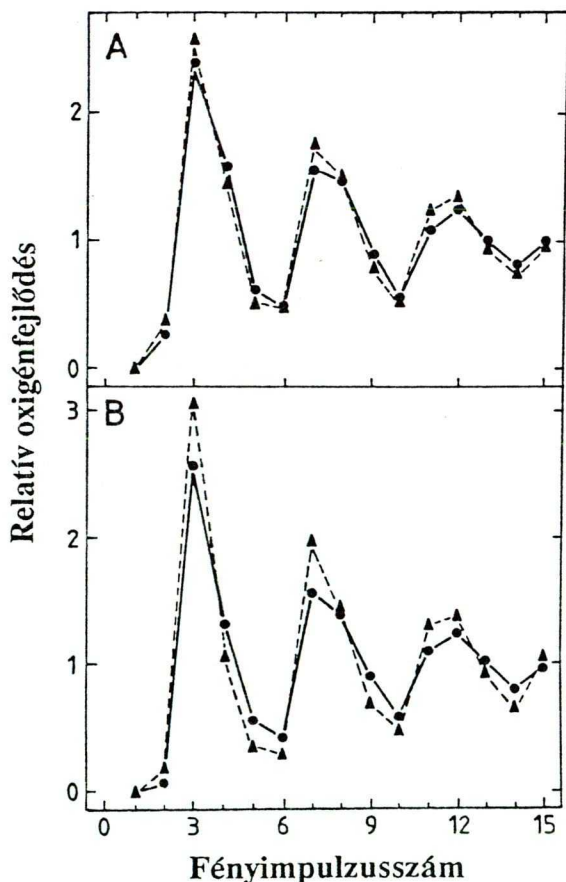
4.7. A termolumineszcencia mérése

A *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium termolumineszcenciáját egy házilag készített berendezésen (Vass és mtsai, 1981) 50 μg Chl *a*/ml koncentrációjú mintákon detektáltuk. A mérések előtt a sejteket 30 másodpercig 10 W/m^2 intenzitású fehér fénnel világítottuk meg, amit 5 perces szobahőmérsékleten történő sötétadaptálás követett. A termolumineszcenciát 5°C-on adott 1 Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozattal gerjesztettük (3 μs , General Radio Stroboslave 1539-A Xenon flash), majd sötétben gyorsan lehűtöttük a mintát -40°C-ra. Erről a hőmérsékletről 20°C/perc fűtési sebességgel fűtöttük fel a mintát, miközben a kibocsátott lumineszcencia fényt folyamatosan detektáltuk. A DCMU-t 50 μM végkoncentrációban – szükség esetén – a 30 másodperces folyamatos megvilágítást követően, az 5 perces sötétadaptálás kezdetén adtuk a mintához.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1. Az S_0 állapot stabilitása

Az S_0 állapot stabilitásának vizsgálatát piaci spenótból izolált tilakoidokon végeztük. Az elővilágítást követően különböző ideig sötétadaptált mintáknak különböző frekvenciájú fényimpulzus sorozattal történő megvilágításakor lényeges változást figyelhetünk meg az egyes oxigén szekvenciákban (3. ábra). Magasabb frekvencia (4 Hz) esetén a harmadik fényimpulzusra felszabaduló oxigén mennyisége nagyobb, a negyedik impulzusra felszabaduló oxigén mennyisége kisebb mint ugyanezen értékek alacsonyabb frekvencia (0.5 Hz) esetén. A különbség már 3 perc sötétadaptálási idő után is értékelhető, de a sötétadaptálási idő növelésével jelentősebbé válik.



3. ábra. Elővilágított, majd 3 (A) ill. 30 (B) percig sötétadaptált spenót tilakoidok oxigénfejlődése 0.5 Hz (●—●) ill. 4 Hz (▲---▲) frekvenciájú fényimpulzus sorozat esetén.

Jelöljük Y_i -vel az i -edik fényimpulzus után felszabaduló oxigén relatív mennyiségét. A 3. ábrán feltüntetett oxigén szekvenciák Y_3/Y_4 értékeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az Y_3/Y_4 érték, eltekintve a "miss" és "double hit" paraméterektől, az S_1/S_0 arányt mutatja. Ha a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciája nagyobb, akkor ez az arány is nagyobb. Ezt első közelítésben úgy értelmezhetjük, hogy magasabb frekvencián nagyobb lesz az S_1 állapotban lévő centrumok hányada, azaz kisebb lesz az S_0 mennyisége. Az Y_3/Y_4 arány sokkal szembetűnőbb változást mutat, ha a sötétadaptálási idő 30 perc. Értéke kb. másfélszeresére nő a frekvencia 0.5 Hz-ről 4 Hz-re való növelésével.

1. táblázat. A 3. ábrán bemutatott oxigén szekvenciák Y_3/Y_4 értékei különböző sötétadaptálási idő után, különböző frekvenciájú fényimpulzus sorozat esetén.

Sötétadapt. idő (perc)	Frekvencia (Hz)	Y_3/Y_4
3	0.5	1.51
	4.0	1.77
30	0.5	1.95
	4.0	2.99

A fenti, kicsit durva közelítéssel kapott eredményt alátámasztja a Kok modell alapján végzett számítógépes görbeillesztés. Az így meghatározott S_0 mennyiségét a 2. táblázatban tüntettük fel. Az S_0 mennyisége alatt mindig azt értjük, hogy a kiinduláskor, a gerjesztő fényimpulzus sorozatot közvetlenül megelőzően a centrumok milyen arányban vannak az S_0 állapotban. Három perces sötétadaptálási idő után az S_0 mennyisége csak kis mértékben csökken a fényimpulzus sorozat frekvenciájának növelésével, a 0.5 Hz-en mért 25%-ról a 4.0 Hz-en mért 22%-ra. Harminc perc sötétadaptálási idő után azonban az S_0 látszólagos mennyisége jelentős frekvenciafüggést mutat: ha a fényimpulzusok közötti idő 2 s (0.5 Hz), akkor S_0 mennyisége 16%, míg ha ugyanezen idő 250 ms (4 Hz), akkor mindössze 1%.

2. táblázat. A Kok modellből meghatározott látszólagos S_0 mennyisége 3 ill. 30 perc sötétadaptálási idő után különböző frekvenciájú fényimplzus sorozat esetén.

Sötétadapt. idő (perc)	Frekvencia (Hz)	S_0
3	0.5	0.25
	1.0	0.23
	4.0	0.22
30	0.5	0.16
	1.0	0.14
	2.0	0.09
	4.0	0.01

Nyilvánvaló azonban, hogy ha a centrumok bizonyos százaléka valóban S_0 állapotban van, akkor az S_0 valódi mennyisége – feltételezve a modell helyességét – nem függhet a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciájától.

Az az eredmény, hogy 30 perc sötétadaptálási idő után 4 Hz fényimpulzus frekvenciánál az S_0 mennyisége gyakorlatilag 0%, azt mutatja, hogy a valódi S_0 mennyiségére a 4 Hz-en kapott eredmények már jó becslést adhatnak. Az alacsonyabb frekvencián végzett mérések az S_0 látszólagos mennyiségét – később részletezendő okok miatt – csak növelhetik, ezért nem alkalmasak a valódi S_0 populáció meghatározására. (4 Hz-nél nagyobb frekvencia alkalmazásának egyelőre technikai akadályai vannak.)

Fentebb elmondottak miatt 4 Hz fényimpulzus frekvenciával mértük meg az S_0 mennyiségének változását a sötétadaptálási idő függvényében. A 3. táblázat ezen mérésekből a Kok modell alapján meghatározott S_0 értékeket tartalmazza.

3. táblázat. A Kok modell alapján meghatározott S_0 mennyisége 4 Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozat esetén különböző sötétadaptálási idők után.

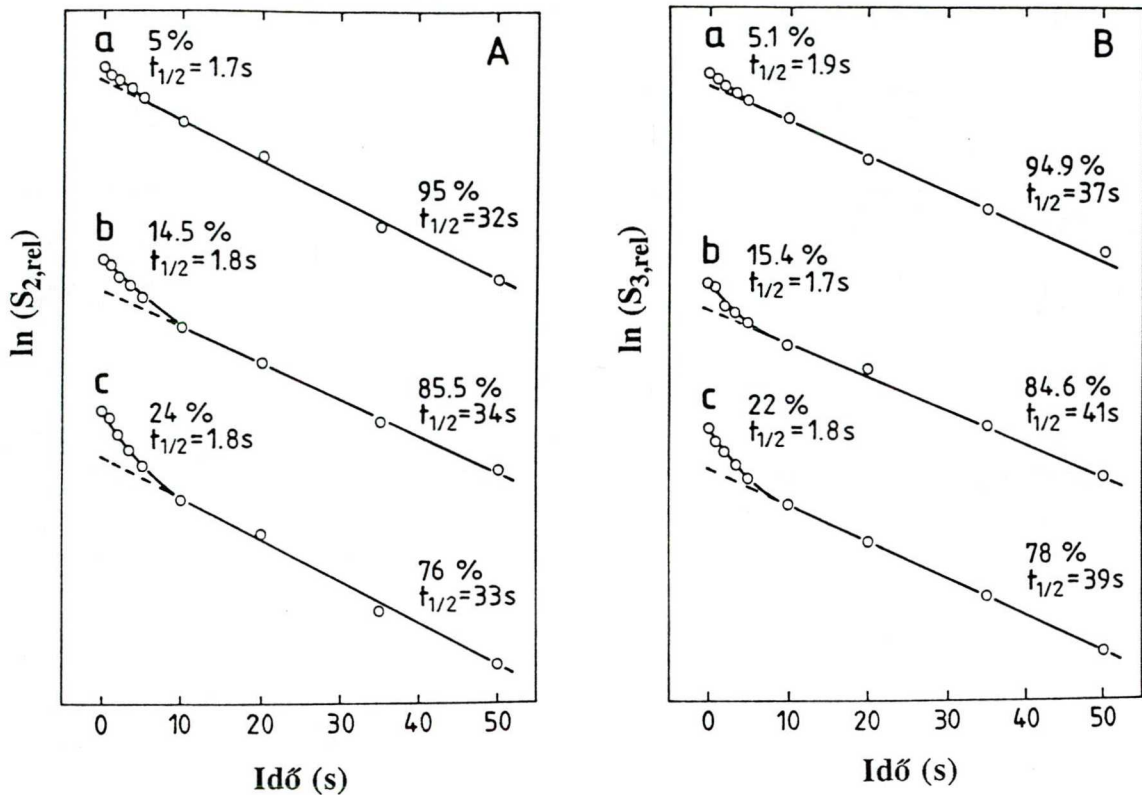
Sötétadapt. idő (perc)	3.0	4.5	8.0	15.0	30.0
S_0 mennyisége	0.22	0.16	0.12	0.07	0.01

(A táblázat adatait az 5. ábrán $\circ$ jelöli.)

Ezekből az adatokból kitűnik, hogy a valódi S_0 mennyisége az elővilágítás végén kialakuló 25%-ról igen erőteljesen lecsökken a sötétadaptálás során. Az S_0 állapot lecsengésének felezési idejét úgy határoztuk meg, hogy a táblázat adatainak logaritmusát a sötétadaptálási idő függvényében ábráztuk. Az így kapott egyenes meredekségéből meghatározott felezési idő 8 perc. Ez az eredmény összhangban van Styring és Rutherford (1987) ESR mérésekkel kapott eredményeivel, de ők a felezési idő értékére 20 percet kaptak. Az eltérés oka lehet az ESR-nél használt különböző vegyszerek jelenléte, a minták különböző minősége, előélete, tárolási módja, a mérési hőmérsékletek különbözősége stb.

5.2. Az S_2 és S_3 állapotok lecsengése a sötétadaptálási idő függvényében

A továbbiakban azt vizsgáltuk, van-e valamilyen hatással a különböző ideig tartó sötétadaptálás az S_2 , S_3 állapotok lecsengésére. Azt találtuk, hogy szobahőmérsékletű mérés esetén a lecsengési görbék két fázisból állnak (4. ábra).

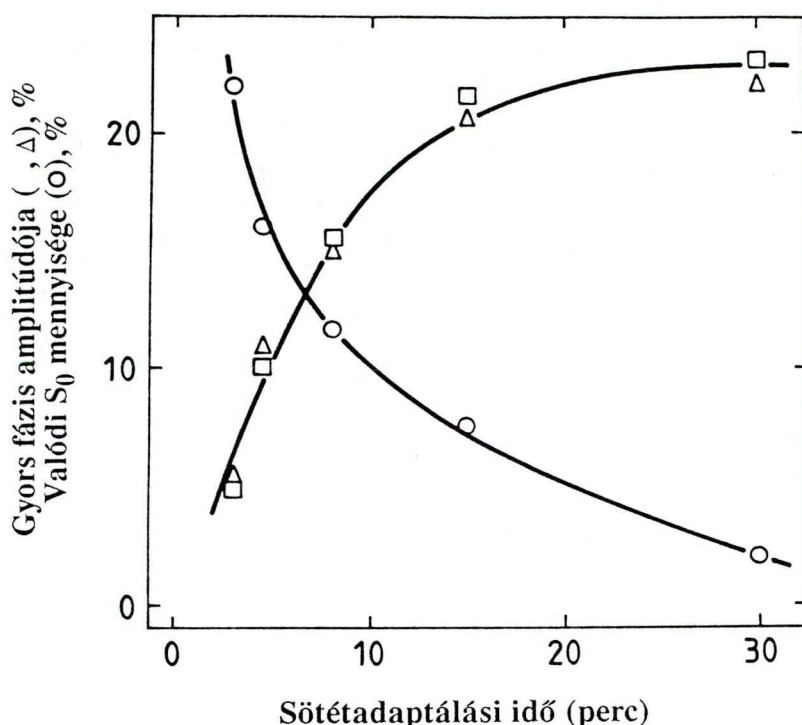


4. ábra. Az S_2 (A) és S_3 (B) állapot lecsengése spenót tilakoidokban különböző sötétadaptálási idők után féllogaritmikus ábrázolásban. Az S_2 ill. S_3 állapot relatív mennyiségét az "Anyagok és módszerek"-ben (4.3.) leírtak szerint határoztuk meg 22°C hőmérsékleten mért oxigén szekvenciákból. Az ábrákon feltüntettük az egyes fázisok félidejét valamint a fázisok relatív amplitúdóját. A sötétadaptálási idő az a, b, c görbék esetén rendre 3, 8, 30 perc.

A gyorsabb fázis félideje egyformán kb. 1.8 s mindkét S állapot esetében, a lassúbb fázisé kb. 33 s ill. kb. 37 s rendre az S_2 , S_3 állapotoknál. A gyors fázis relatív amplitúdója nő a sötétadaptálási idő növelésével, mindkét állapot lecsengésében igen hasonló mértékben. Három perc sötétadaptálási idő után mindössze 5.0% ill. 5.1%, míg 30 perc után már 24%, ill. 22% rendre az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében.

Ezek után összehasonlítottuk az S_0 állapot és az S_2 , S_3 lecsengésében jelentkező gyors fázis relatív amplitúdójának változását a sötétadaptálási idő függvényében (5. ábra). Az S_0 állapot eltűnését a gyors fázis relatív amplitúdójának komplementer növekedése kíséri. Ez arra utal, hogy igen szoros összefüggés kell, hogy legyen a valódi S_0 eltűnése és a gyors fázis amplitúdójának növekedése között.





5. ábra. A 4 Hz-en mért valódi S_0 (adatok a 3. táblázatban) mennyisége (O), valamint az S_2 (□), S_3 (Δ) állapot lecsengésében jelentkező gyors fázis relatív amplitúdója a sötétadaptálási idő függvényében.

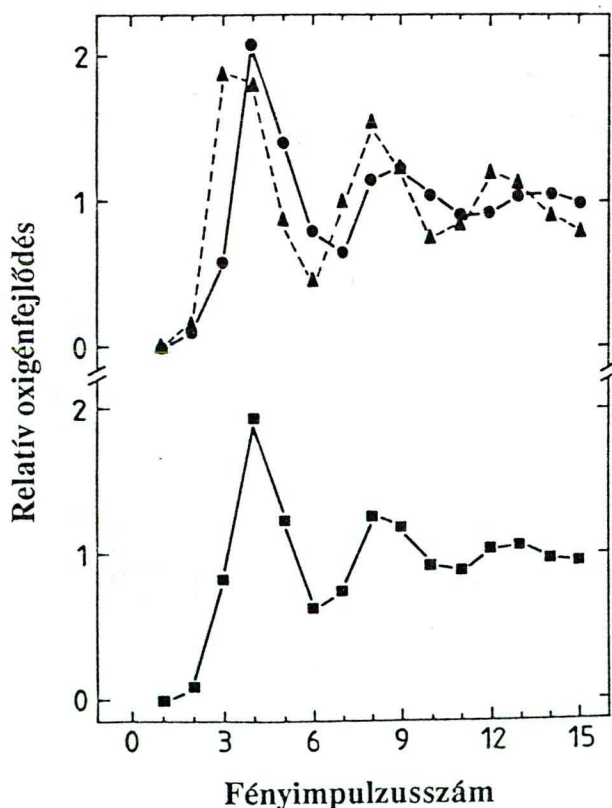
5.3. A redukált Tir-D donor hatása az S_2 , S_3 állapotok lecsengésére

Styring és Rutherford (1987) ESR mérések alapján megállapították, hogy az S_0 állapot sötétben S_1 állapotba alakul át, amit a második fotokémiai rendszer Tir-D donorjának redukciója követ. Összevetve ezt eredményeinkkel feltételeztük, hogy az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében jelentkező gyors fázis a redukált Tir-D-től származik. Az S_0 állapot eltűnésével a redukált Tir-D mennyisége megnövekszik, mivel az S_0 állapot S_1 állapotba való átalakulásához szükséges pozitív töltést a Tir-D oxidált formájától nyeri, ami ezáltal redukálódik. Így a sötétadaptálási idő növelésével egyre nagyobb mennyiségben jelenlévő redukált donortól származó gyors elektronátadás eredményezheti az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a sötétadaptálási időben növekvő amplitúdójú gyors fázist. Minél kevesebb a valódi S_0 mennyisége, annál több a redukált donor és annál nagyobb a gyors fázis relatív amplitúdója.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a Tir-D redox állapotát kémiai úton (pl. redukált DCPIP-vel) befolyásolni lehet (Velthuys and Visser, 1975). Ha a Tir-D donort nagymértékben redukáljuk, akkor az előbbieik alapján az várható, hogy az S_2 ,

S_3 lecsengésében a gyors fázis amplitúdója jelentősen megnő.

Feltevésünk ellenőrzésére – azaz, hogy a gyors fázis valóban a redukált Tir-D-ből származó gyors elektronátadás következménye – a tilakoidokat redukált DCPIP-val kezeltük. A kezelés hatására az oxigén szekvenciákban igen érdekes változást figyelhettünk meg (6. ábra, felső két görbe). Ha a mintát nem világítottuk elő és ha a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciája 0.5 Hz volt, akkor – a megszokottól eltérően – az első oxigén maximum a negyedik fényimpulzusnál jelentkezett. Az Y_3/Y_4 arány 0.28, a Kok modellből meghatározott S_0 mennyisége 92% volt, mintha a centrumok nagy hányada az S_0 állapotba került volna a kezelés következtében. Hogy ez nem valódi S_0 állapot, azt az bizonyítja, hogy elővilágítás nélkül, 4 Hz frekvencia esetén az $Y_3/Y_4=1.04$, a Kok modellből meghatározott S_0 mennyisége 41%-nak adódik és a első maximum a harmadik fényimpulzusnál van. Egy valódi S_0 populáció pedig a korábban említettek szerint nem függhet a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciájától.



6. ábra. A Tir-D donort redukáló kémiai kezelés (0.075 mM DCPIP és 0.75 mM Na-aszkorbát) hatása a különböző frekvenciájú fényimpulzus sorozattal gerjesztett oxigén szekvenciákra. A felső két görbe elővilágítás nélküli (0.5 Hz: ●—●, 4.0 Hz: ▲---▲), míg az alsó görbe felvételénél elővilágításként 1 fényimpulzust alkalmaztunk, amit 3 perc sötétadaptálás követett (0.5 Hz: ■—■).

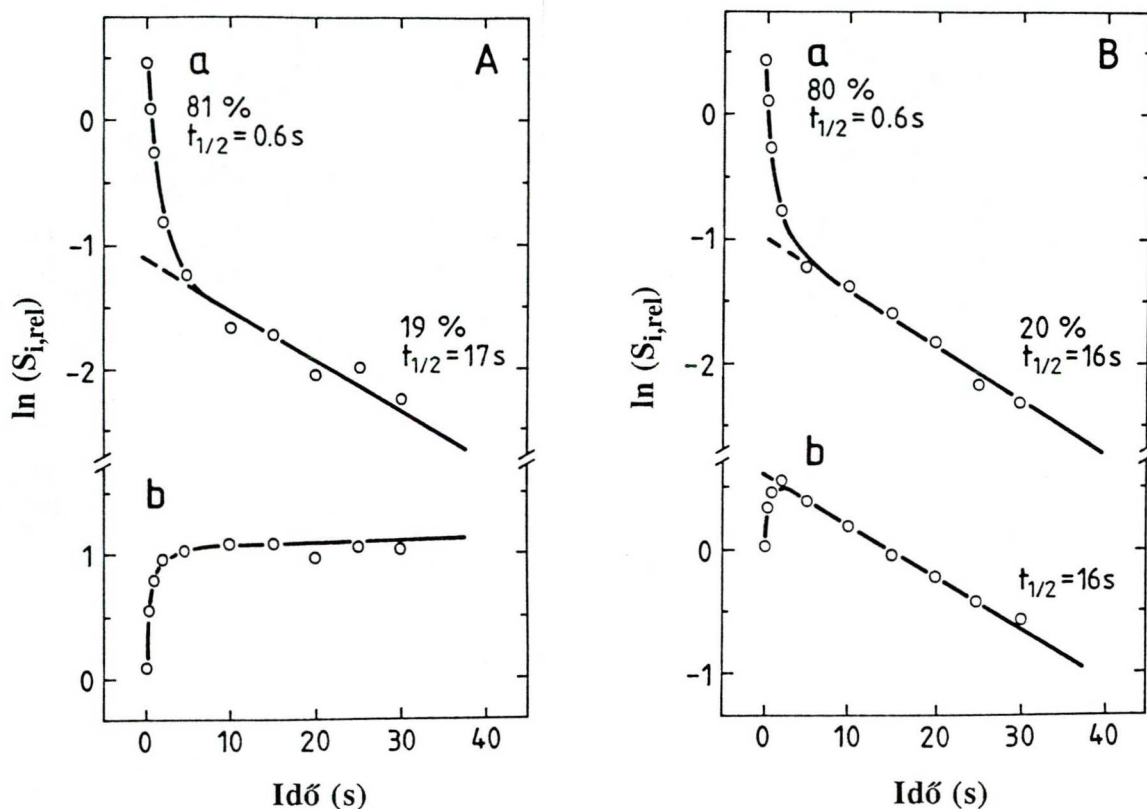
Látszólagos és frekvenciafüggő S_0 populációt többek között olyan folyamat hozhat létre, melynek során igen gyors elektronátadás következtében az S_2 , S_3 állapotok visszaalakulhatnak az S_1 , S_2 állapotokba. Ekkor ugyanis 0.5 Hz frekvencia esetén ez az elektronátadás is le tud játszódni – a fényimpulzusok közötti 2 s elég idő erre – és ez igen jelentős látszólagos S_0 populációt eredményezhet. Ezzel szemben 4 Hz frekvencia esetén a fényimpulzusok közötti 250 ms már nem elég ahhoz, hogy az első néhány impulzus közötti idő alatt a fenti folyamat számottevő mértékben vissza tudja fordítani az S_2 , S_3 állapotokat és ezzel megnövelje az S_0 mennyiségét. Ehhez az elektronátadáshoz megfelelő donornak tűnik a redukált Tir-D, melynek mennyisége nagy mértékben megnőtt a DCPIP/aszkorbát kezelés hatására.

Ha 50, vagy akár 1 fényimpulzussal elővilágítottuk a mintát és megmértük az oxigénfejlődést 0.5 Hz fényimpulzus frekvencia mellett (6. ábra, alsó görbe), csak egészen kicsi változást ($Y_3/Y_4=0.44$, $S_0=83\%$) figyeltünk meg az első esethez ($Y_3/Y_4=0.28$, $S_0=92\%$) képest. Ez érthető is, mivel a mintában jelenlévő DCPIP és aszkorbát az elővilágítás alatt oxidálódott Tir-D-t visszaredukálja, a redukált donor pedig a fentiekben leírtak szerint látszólagos S_0 populációt eredményezhet.

Feltevésünket, hogy az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében jelentkező gyors fázis a redukált Tir-D-től származik, a következő eredmények igazolják. A redukáló kezelés hatására az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a gyors fázis igen jelentősen megnőtt (7. ábra, felső görbék). A 30 perc sötétadaptálási idő után mért lecsengésekben a gyors fázis relatív amplitúdója 24%, 22%, míg a kezelés hatására ezek az értékek 81%-ra, 80%-ra nőttek az S_2 ill. S_3 esetében. A gyors fázishoz tartozó felezési idő 0.6 s, 0.6 s, a lassú fázishoz tartozó pedig 17 s, 16 s volt rendre az S_2 , S_3 állapotoknál.

A kontroll minták S_2 és S_3 állapotainak lecsengésében, amiket redukáló kezelés nélkül, elővilágítással, és 3 perc sötétadaptálási idővel, 29°C hőmérsékleten vettünk fel, ezek a félidők a gyors fázisnál 1.1 s, 1.1 s, a lassú fázisnál 21 s, 22 s-nak adódtak. A redukálószerrel kezelt mintákban a felezési idők csökkentek, s ez valószínűleg a használt vegyszereknek (DCPIP, aszkorbát) az S állapotok stabilitására gyakorolt hatásának tulajdonítható.

Az irodalomban megjelentek olyan feltételezések is, melyek szerint az S_2 , S_3 állapotok kétértékű visszalépéssel csengenek le, azaz az $S_3 \rightarrow S_1$ és $S_2 \rightarrow S_0$ átmenetek játszódnak le (Lavorel és Maison-Peteri, 1983). Más szerzők szerint (Joliot és Kok, 1975, Hanssum és mtsai, 1985) az S_2 , S_3 állapotok rendre az S_1 , S_2 állapotokba csengenek le, vagyis a lépések egyértékűek. Kísérleti eredményeink ez utóbbit támasztják alá. Az S_2 , S_3 lecsengésekkel (7. ábra, felső görbék) párhuzamosan az ugyanezen oxigén szekvenciákból számolt S_1 ill. S_2 állapotban lévő centrumok relatív mennyiségének változását (7. ábra, alsó görbék) is meghatároztuk.



7. ábra. A Tir-D donor kémiai redukciójának hatása az S_2 (A,a) állapot S_1 (A,b) állapotba és az S_3 (B,a) állapot S_2 (B,b) állapotba való lecsengésére. A spenót tilakoidokat 0.075 mM DCIP-vel és 0.75 mM Na-aszkorbáttal inkubáltuk. A méréseket 28°C hőmérsékleten végeztük. Az S állapotok relatív mennyiségét az "Anyagok és módszerek"-ben (4.3.) leírtak szerint határoztuk meg egy (A) ill. kettő (B) fényimpulzus elővilágítást követő oxigén szekvenciákból.

Az S_2 gyors fázisa alatt az S_1 állapot erőteljesen felhalmozódik; a lassú fázis alatt ugyancsak nő az S_1 mennyisége, de csak igen kis mértékben (7. ábra, A). Ez azzal magyarázható, hogy amíg a redukált Tir-D nagy mennyiségben van jelen, addig a tőle származó elektron az S_2 -t igen gyorsan (0.6 s felezési idővel) az S_1 állapotba fordítja át, az S_1 mennyisége nő. Ha a redukált donor elfogyott, az S_2 más lassúbb folyamat révén fordul át S_1 -be, s az S_1 mennyisége lassan eléri egy állandó értéket. Ez azt mutatja, hogy az S_1 állapot valóban stabil sötétben.

Az S_3 állapot lecsengésekor az S_2 állapot relatív mennyiségének változása egészen más jellegű (7. ábra, B). Az S_3 állapotból induló reakció a redukált Tir-D-től érkező elektron által a gyors fázis alatt megnöveli az S_2 mennyiségét. Az S_2 azonban nem stabil állapot. Az S_2 mennyisége mindaddig nő, amíg az S_3 -nak S_2 -be való

átfordulása túlsúlyban van az S_2 -nek S_1 -be való konverziójával szemben. Ez utóbbi lassúbb folyamat, felezési ideje 17 s, de – az alább részletezendő okok miatt – nem a redukált Tir-D donortól származó gyors elektronátadás következménye. Az S_2 mennyiségét csökkentő folyamat csak akkor kerül előtérbe, ha a redukált Tir-D mennyisége kellőképpen lecsökken. Az S_2 csökkenésének felezési ideje 16 s, ami igen jó egyezést mutat az S_1 állapot mennyiségének növekedésében a lassú fázis 17 s-os félidejével. Ez arra enged következtetni, hogy a két esetben azonos folyamatról van szó.

Az a kísérleti eredmény, hogy az S_2 és az S_3 állapotok lecsengésében a gyors fázis relatív amplitúdója minden megfelelő S_2 , S_3 pár esetén jó egyezést mutat, egy igen lényeges következtetésre ad lehetőséget. Fontos annak tisztázása, hogy a Tir-D csak saját reakciócentrumán belül működik donorként, vagy egy esetleges mozgásra képes töltéshordozó segítségével más centrumoknak is képes elektront adni. Tekintsünk egy adott reakciócentrumot, melynél a vízbontó enzim oxidációs állapota S_3 . A reakciócentrumhoz kötött Tir-D legyen redukált, így az S_3 gyors elektronátadás következtében az S_2 -be alakul. Ha létezne egy mobil töltéshordozó, ami képes a redukált donor elektronját az egyik reakciócentrumtól egy másikhoz vinni, akkor ez az S_2 állapot is tovább tudna alakulni az S_1 állapotba egy másik centrumhoz kötött redukált donortól érkező elektron felvételével. Ebben az esetben azonban az S_3 gyors fázisának relatív amplitúdója közel a fele kellene, hogy legyen az S_2 -ének. A mérések ezzel szemben egyforma relatív amplitúdót mutatnak az S_2 és S_3 esetében (4. ábra; 7. ábra, felső görbék), tehát a redukált Tir-D csak ahhoz a vízbontó rendszerhez ad egy elektront, melyhez ő maga is kötött; a redukált donor és az S_2 , S_3 állapotok közötti reakció elsőrendű kinetikájú.

Az eddigiekben nem szóltunk az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében jelentkező lassú fázis eredetéről. Mint azt a bevezetésben említettük, kézenfekvő magyarázat lehetne, hogy a lassú fázis az S_2 , S_3 állapotoknak és az egyszerűen redukált másodlagos akzeptornak (Q_B^-) a töltésrekombinációjából származik. Ezt a töltésrekombinációt késleltett lumineszcencia és termolumineszcencia mérésekkel nyomon lehet követni. Mindkét mérésből meghatározható a folyamat félideje, ami szobahőmérsékleten 30-50 s (Demeter és Vass, 1984; Hideg és Demeter, 1986). Az S_2 és S_3 állapotokra kapott eredményeink is ebbe az intervallumba esnek; S_2 esetén a lassú fázis félideje 33 s, S_3 esetén 37 s, 23°C hőmérsékleten. A későbbiekben tárgyalandó hőmérséklet-függésből kapott aktiválási energia értéke is egyezik a termolumineszcencia mérésekből számított aktiválási energia értékkel (Vass és mtsai, 1981; Vass és mtsai, 1987c).

A hasonlóság azonban nem teljes a lumineszcencia félidők és a oxigén mérésekből származó félidők között. A Q_B másodlagos akceptor igen hosszú ideig

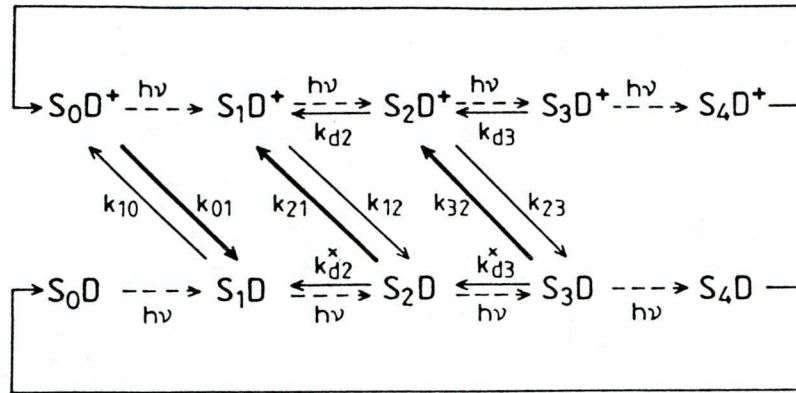
képes egyszeresen redukált állapotban maradni, a kétszeresen redukált állapota (Q_B^{2-}) viszont nagyon gyorsan oxidált állapotba alakul át. Elővilágítás után a centrumoknak kb. felénél a másodlagos akceptor oxidált állapotú, a másik felénél egyszeresen redukált állapotú, azaz $Q_B:Q_B^- = 0.5:0.5$. Hosszú, kb. 6 órás sötétadaptálási idő alatt ez az arány eltolódik, $Q_B:Q_B^- = 1:0$, a másodlagos akceptor teljes mértékben oxidált állapotú lesz (Demeter és Vass, 1984). Oxigén méréseinkben a leghosszabb sötétadaptálási idő is csak 30 perc volt. Ez alatt az idő alatt a $Q_B:Q_B^- = 0.5:0.5$ arány nem változik jelentősen, így a centrumoknak csak kb. a felénél található meg az S_2 , S_3 állapotokkal töltésrekombinációra képes Q_B^- . Az oxidált állapotú másodlagos akceptorral bíró centrumok vízbontó enzimének S_2 , S_3 állapotait a plasztokinol molekula tudja deaktiválni (Rutherford és mtsai, 1984). Azokban az esetekben, amikor mind a Q_B , mind a plasztokinon "pool" oxidált állapotú – mint pl. fenil-*p*-benzokinon jelenlétében –, akkor az S_2 , S_3 állapotok stabilitása 3-4 percre nő meg (Styring és Rutherford, 1988).

5.4. A Kok modell módosítása

A Kok modell szerint folyamatos fénnel, vagy elegendően sok fényimpulzussal történő elővilágítás után a centrumok egyenletesen oszlanak meg az S_0 , S_1 , S_2 , S_3 állapotok között és a Tir-D teljes mértékben oxidált. Két-három perces sötétadaptálás alatt az S_2 , S_3 állapotok az S_1 -be konvertálódnak, így a centrumok 25%-a S_0 , 75%-a S_1 állapotba kerül, a Tir-D továbbra is oxidált.

Eredményeink alapján a Kok modell alábbiakban leírt módosítását javasoljuk. A módosítás nem érinti a közvetlenül az elővilágítás után kialakuló S állapotok eloszlását, amit egyenletesnek tételezünk fel. A sötétadaptálással azonban, a fent leírtak mellett, egy másik folyamat is kezdetét veszi. Az S_0 állapot nem stabil sötétben, hanem méréseink szerint 23°C hőmérsékleten kb. 8 perces felezési idővel spontán módon az S_1 állapotba konvertálódik. A konvertáláshoz szükséges pozitív töltések az oxidált Tir-D sztöhiometrikus részének redukációjából származnak. A sötétadaptálást követő fényimpulzus sorozat hatására a redukált donortól gyors elektronátadás történik kb. 1.8 s felezési idővel (23°C hőmérsékleten) a vízbontó enzim S_2 , S_3 állapotához mindaddig, amíg a donor teljes mennyisége oxidált állapotba nem kerül. Ez az S_2 , S_3 lecsengésében a redukált Tir-D populációjával arányos amplitúdójú gyors fázist és egy látszólagos, frekvenciafüggő S_0 populációt eredményez.

A Tir-D donor és a vízbontó enzim közötti komplex töltésegyensúlyt az alábbi vázlatban foglaltuk össze:



A Tir-D oxidált állapotát D^+ -szal, redukált állapotát D -vel jelöltük. A D stabilitása az S_1 és a D^+ stabilitása az S_2 és S_3 állapotokban azt mutatja, hogy a sebességi állandókra fennállnak a következő összefüggések: $k_{10} \ll k_{01}$, $k_{21} \gg k_{12}$ és $k_{32} \gg k_{23}$. Továbbá a gyors fázis felezési idejének hasonlóságából az S_2 és S_3 állapotban következik, hogy $k_{21} \approx k_{12}$. Jelöljük ezt a sebességi állandót k_D -vel.

Matematikailag a módosított modellt is a Lavorell-féle mátrix formalizmus segítségével írhatjuk le. Jelöljük S -sel az $\{S_0, S_1, S_2, S_3\}$ állapotokból álló oszlopvektort, K -val az átmeneti mátrixot.

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} \quad K = \begin{bmatrix} \alpha & 0 & \gamma & \beta \\ \beta & \alpha & 0 & \gamma \\ \gamma & \beta & \alpha & 0 \\ 0 & \gamma & \beta & \alpha \end{bmatrix}$$

Az átmeneti mátrix α , β , γ elemei a bevezetőben említett "miss", "single hit", "double hit" paramétereknek felelnek meg.

Az eredeti Kok modell az $S^{(i+1)} = K S^{(i)}$ vektoregyenlettel írható le, ahol $S^{(i)}$ jelöli az i -edik fényimpulzus után kialakult állapotvektort.

A módosított modellben az S állapotok közötti átmenetet a Tir-D donor is befolyásolja. Ezt a következőképpen vehetjük figyelembe. A reakciócentrumokban a donor vagy oxidált (D^+) vagy redukált (D) állapotban van. Jelöljük SD -vel azt az oszlopvektort, melynek elemei $\{S_0D, S_1D, S_2D, S_3D\}$ és SD^+ -szal azt, melynek elemei $\{S_0D^+, S_1D^+, S_2D^+, S_3D^+\}$. Az SD ill. SD^+ tehát olyan S állapotokat foglal magába, melyek mellett a Tir-D rendre redukált ill. oxidált állapotú. A felsorolt állapotok – eltekintve az instabil S_4D , S_4D^+ állapotoktól – minden lehetőséget kimerítenek. Minden reakciócentrum állapota egyike a fentieknek, ezért fenáll:

$$\sum_{n=0}^3 S_n D + \sum_{n=0}^3 S_n D^+ = 1 \quad (1)$$

(A teljes reakciócentrumszám 1-re normált.)

Ha a Tir-D donor hatásától eltekintünk, az $(i+1)$ -edik fényimpulzus után kialakuló állapotot a következő egyenletekkel írhatjuk le:

$$SD^{+(i+1)} = K SD^{+(i)} \quad (2)$$

$$SD^{(i+1)} = K SD^{(i)} \quad (3)$$

Természetesen a fenti (1) összefüggésnek minden i -re fenn kell állnia. A (2) és (3) formulák segítségével az $(i+1)$ -edik fényimpulzus után kialakuló $S_n^{(i+1)}$ ($n=0,1,2,3$) állapot az $S_n D^{(i+1)} + S_n D^{+(i+1)}$ összeggel számítható ki.

A Tir-D azonban összekapcsolja a (2) és (3) – eddig független – egyenleteket azzal, hogy végbemennek az alábbi reakciók:



Ha a fényimpulzus sorozat frekvenciája ν , akkor két egymást követő fényimpulzus közötti $1/\nu$ idő alatt az $S_m D$ mennyisége a következő értékre csökken (az m index a továbbiakban is csak a 2, 3 értékeket veheti fel):

$$[S_m D] = [S_m D]_0 \exp(-k_D/\nu)$$

ahol k_D az S_2, S_3 lecsengésében a gyors fázis felezési idejének megfelelő sebességi állandó ($k_D = \ln 2/t_{1/2}$), $[S_m D]_0$ a figyelembe vett két impulzus közül közvetlenül az első után meglévő $S_m D$ mennyisége. Mivel a gyors fázis felezési ideje méréseink szerint közel egyenlő az S_2, S_3 lecsengésekben, ezért k_D -t azonosnak tekintjük az $m=2,3$ esetén. Az $S_m D$ változásának értékét jelöljük $\Delta S_m D$ -vel:

$$\Delta S_m D = [S_m D]_0 - [S_m D] = [S_m D]_0 (1 - \exp(-k_D/\nu)).$$

Két egymást követő fényimpulzus közötti idő alatt az $S_m D$ értéke $\Delta S_m D$ -vel csökken, az $S_{m-1} D^+$ pedig $\Delta S_m D$ -vel nő. Legyen a két tekintetbe vett fényimpulzus az (i) -edik és $(i+1)$ -edik. Az (i) -edik fényimpulzus után kialakult $[S_m D]^{(i)}$, $[S_{m-1} D^+]^{(i)}$ értékek az $(i+1)$ -edik impulzus érkezésekor a következő értékkel bírnak:

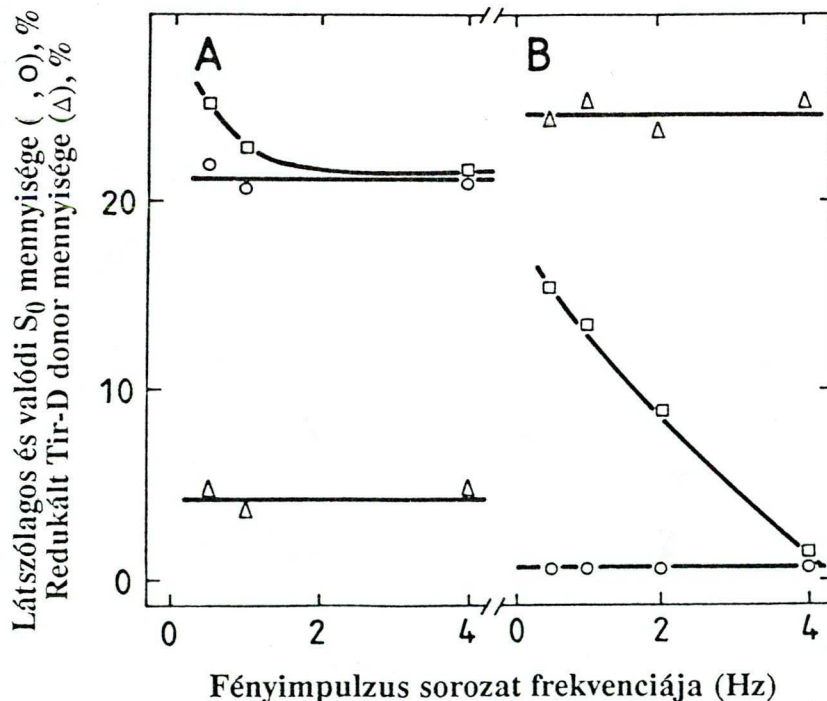
$$[S_m D]^{(i)}_a = [S_m D]^{(i)} - \Delta S_m D$$

$$[S_{m-1} D^+]^{(i)}_a = [S_{m-1} D^+]^{(i)} + \Delta S_m D$$

ahol $\Delta S_m D = [S_m D]^{(i)} (1 - \exp(-k_D/\nu))$. Az a index az aktuális állapotra utal, azaz a (2) és (3) egyenletekben ezekkel a módosított értékekkel kell a rekurziót folytatni. A modell számítógép segítségével könnyen és gyorsan kezelhető. A számítógépes görbeillesztésnél a variálható paraméterek száma az eredeti Kok modellhez képest 2-vel nőtt. Az egyik paraméter az $S_1 D$ populáció. A Kok modell – figyelembe véve, hogy $S_0 + S_1 = 1$ (a kezdeti állapotban $S_2 = 0, S_3 = 0$) – csak egy állapotot (S_0) tekintett változtathatónak. A módosított modellben a kiindulási állapotban fenáll a következő összefüggés $S_0 D^+ + S_1 D^+ + S_1 D = 1$. Ez az összefüggés a 3 populációból egyet meghatároz, a másik kettő értéket kell megfelelően változtatni. A kiindulási állapotokat meghatározó variálható paraméterek száma tehát eggyel nőtt. A másik paraméter a k_D sebességi állandó. Ennek értékét a mérésekből meghatározott felezési idők ismeretében rögzítettük, éppen a variálható paraméterek számának

csökkentése céljából.

A módosított modellel végzett fittelések eredménye látható a 8. ábrán, ahol feltüntettük a 2. táblázat adatait is. Az eredeti Kok modellből meghatározható látszólagos S_0 populáció – ellentmondásosan – a 3 perc sötétadaptálás után csak kismértékű, míg 30 perc sötétadaptálás után igen jelentős frekvenciafüggést mutat. Ezzel szemben a módosított modellel végzett illesztések eredményeként kapott valódi S_0 populáció és a redukált Tir-D mennyisége függetlennek adódik a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciájától. Három perc sötétadaptálás után a valódi S_0 21%, a redukált D donor 4%, míg 30 perc sötétadaptálás után a valódi S_0 mennyisége mindössze 1%, a redukált donor mennyisége pedig kb. 25%-ra nőtt. Ezekkel az eredményekkel, figyelembe véve, hogy a mérések hőmérsékletén a redukált Tir-D kb. 1.8 s-os félidővel képes elektront adni az S_2 , S_3 állapotoknak, már jól értelmezhető a látszólagos S_0 populáció frekvenciafüggése. Tekintsük példának a 30 perc sötétadaptálás esetét. Fél Hz fényimpulzus frekvenciánál, a fényimpulzusok közötti 2 s alatt a nagy mennyiségű (25%) redukált Tir-D már az első néhány impulzus közötti idő alatt képes az S_2 , S_3 állapotokhoz adott elektronnal az igen kis mennyiségben jelenlevő valódi S_0 populációhoz egy jelentős mértékű látszólagos S_0 populációt is hozzáadni. Ezért láthatunk 0.5 Hz frekvencia esetén az eredeti Kok modellel kb. 16%



8. ábra. Az eredeti Kok modell alapján meghatározott látszólagos S_0 populáció (□), a módosított modell alapján meghatározott valódi S_0 populáció (○), és a redukált Tir-D donor mennyisége (Δ) a gerjesztő fényimpulzus sorozat frekvenciájának függvényében 3 (A) ill. 30 (B) perc sötétadaptálás után.



S_0 -t. Négy Hz frekvenciánál a fényimpulzusok közötti 250 ms nem elég ahhoz, hogy a fentebb leírtak teljesüljenek. Itt is megtörténik ugyan a redukált Tir-D-ről az elektronátadás az S_2 , S_3 állapotokhoz, de nem az első néhány impulzus közötti időre koncentrálva, hanem szétosztva több, akár 8-10 periódusnyi időre. Megjegyezzük, hogy ez a folyamat a 3 perc sötétadaptálási idő után 4 Hz fényimpulzus frekvenciával végzett méréshez viszonyítva kis mértékben megnöveli a "miss" faktor értékét.

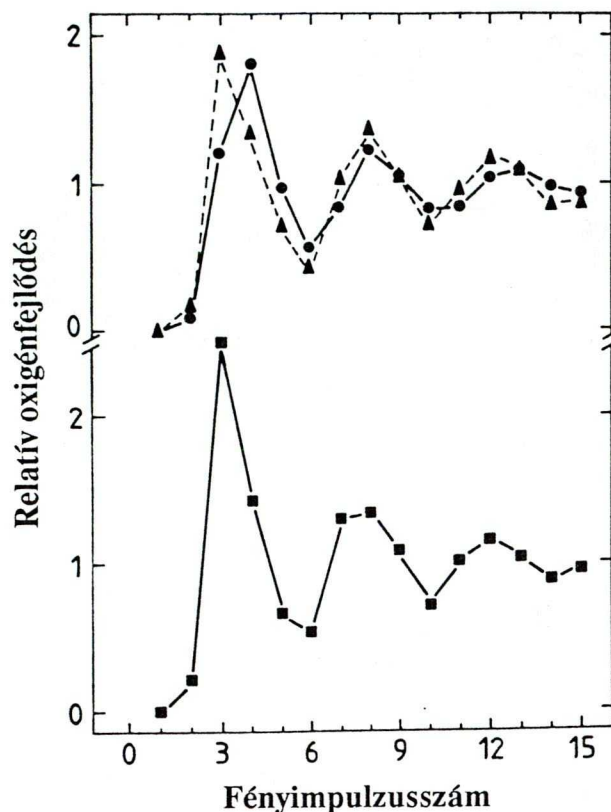
5.5. A Tir-D lassú redukciója -70°C hőmérsékleten

Az előzőekben bemutattuk, hogy kémiai módszerekkel a Tir-D redox állapota megváltoztatható: ha az izolált tilakoidokhoz DCPIP-t és aszkorbátot adunk, a Tir-D teljes mértékben redukálódik. A kezelés hatására az oxigénkiválasztás első maximuma 0.5 Hz fényimpulzus frekvencia esetén a negyedik impulzusra tolódott, az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a gyors fázis relatív amplitúdója kb. 80%-ra nőtt.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Tir-D redox állapota nemcsak kémiai kezelés hatására változik meg, hanem hosszú ideig, sötétben, igen alacsony hőmérsékleten történő tárolás során is képes a Tir-D redukálódni. Ha a tilakoidokat sötétben -70°C hőmérsékleten több hónapig tároljuk, az oxigén szekvenciák és az S_2 , S_3 állapotok lecsengései – a kémiai redukciónál tapasztaltakhoz hasonlóan – jelentős változást mutatnak. A továbbiakban az ily módon tárolt tilakoidokat az oxigén szekvencia eltolódott maximuma miatt "átfordult" mintának fogjuk nevezni.

A 9. ábrán a 20 hétig -70°C-on tárolt tilakoidok fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődése látható. A felső két oxigén szekvencia bizonyos tekintetben nagyfokú hasonlóságot mutat a 6. ábra (a Tir-D donort redukáló kémiai kezelés hatása) megfelelő görbéivel. Az "átfordult" mintában is az elővilágítás nélkül, 0.5 Hz gerjesztő fényimpulzus frekvencia mellett mérhető első oxigén maximum a negyedik impulzusnál jelentkezik, de a Kok modellből meghatározott látszólagos S_0 értéke csak 61% (9. ábra, ●—●), míg a kémiaileg kezelt minta esetén 92% (6. ábra, ●—●) volt. Szintén elővilágítás nélkül, de 4 Hz frekvencia esetén azonban az irodalomból jól ismert képet kaptuk: az első oxigén maximum a harmadik impulzusnál jelentkezett. A látszólagos S_0 mennyisége az "átfordult" mintában 27% (9. ábra, ▲---▲), a kémiaileg kezelt mintánál 41% (6. ábra, ▲---▲) volt.

Érdekes különbséget figyelhettünk meg az átfordult ill. a kémiaileg kezelt minták között amennyiben egy fényimpulzussal történő elővilágítás után a mintát 3 percet sötétadaptáltuk, majd megmértük a 0.5 Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozat által indukált oxigénkiválasztást. A kémiai kezelésnél – amikor is a DCPIP-t és az aszkorbátot nem mostuk ki a mintából – az első oxigén maximum az elővilágítástól



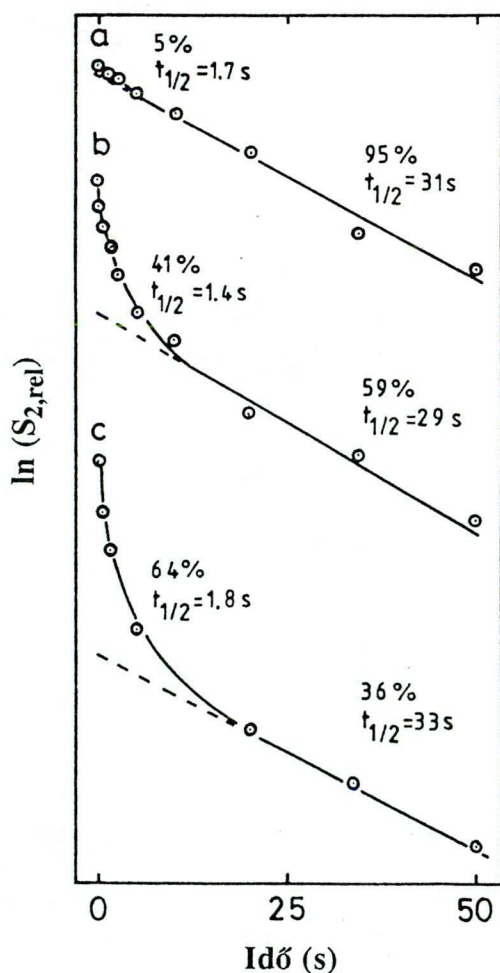
9. ábra. Húsz hétig -70°C hőmérsékleten tárolt tilakoidok oxigén szekvenciái különböző frekvenciájú fényimpulzus sorozat mellett. A felső két görbe elővilágítás nélküli (0.5 Hz: ●—●, 4.0 Hz: ▲---▲), az alsó görbe esetén elővilágításként 1 fényimpulzust alkalmaztunk, amit 3 perc sötétadaptálás követett (0.5 Hz: ■—■).

függetlenül a negyedik impulzusnál jelentkezett. Ezzel szemben a hosszú ideig, alacsony hőmérsékleten tárolt és elővilágított mintában már a harmadik impulzusra megjelenik az első maximum (9. ábra, ■—■). A látszólagos S_0 mennyisége csak 11%. Tehát egyetlen egy fényimpulzus képes megszüntetni az elővilágítás nélküli, 0.5 Hz frekvencia mellett tapasztalt rendellenességet a kémiaailag nem kezelt, "átfordult" mintában.

A redukált Tir-D-től az S_2 , S_3 állapotokhoz történő gyors elektronátadás lehetőségének ismeretében a fentiek értelmezése a következő. Ha a redukált donor mennyisége jelentős, akkor a közte és az S_2 , S_3 állapotok között létrejövő töltésátadás miatt alacsony fényimpulzus frekvencia mellett (hosszú periódus idő) a látszólagos S_0 mennyisége jelentős mértékben növekedhet (9. ábra, ●—●). A 9. ábra alsó görbéjének értelmezése a következő. Tegyük fel, hogy az elővilágítás előtt a centrumok 10-15%-a van S_0 állapotban, 85-90%-a S_1 -ben, és a donornak kb. 40-60%-a redukált állapotú. (A későbbiekben ezt a feltételezést megindokoljuk ill. alátámasztjuk.) Az elővilágításként alkalmazott egyetlen fényimpulzus hatására

bekövetkeznek az $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ átmenetek, így a centrumok nagy része S_2 állapotba kerül. Az S_2 és a redukált donor közötti töltésátadás a 3 perces sötétadaptálási idő alatt oxidálja a redukált Tir-D tetemes hányadát. Így a méréskor már nem történhetnek meg a redukált donornak köszönhető gyors $S_2 \rightarrow S_1$, $S_3 \rightarrow S_2$ visszalépések, nincs a valódi S_0 -t növelő látszólagos populáció. A kémiai kezelésnél, mivel a mintából nem mostuk ki a Tir-D-t redukálni képes reagenseket, az egyszeri fényimpulzus után oxidált állapotba került Tir-D újra redukálódik, és alacsony fényimpulzus frekvencia esetén képes látszólagos S_0 populációt létrehozni, azaz az első oxigén maximum itt a negyedik impulzusnál jelentkezik.

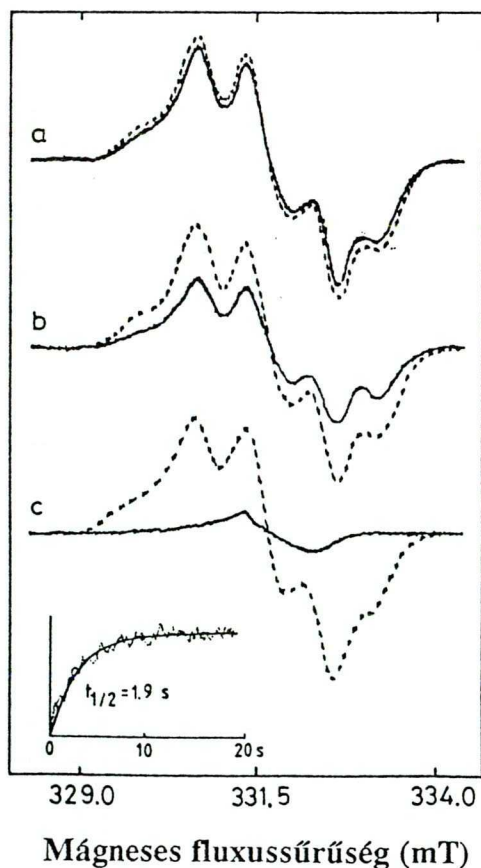
A Tir-D⁺ alacsony hőmérsékleten történő redukciója az S_2 , S_3 állapotok lecsengéseinek vizsgálatával már közelebbről tanulmányozható. A 10. ábra a -70°C hőmérsékletű tárolás hatását mutatja az S_2 állapot lecsengésére: a gyors fázis relatív amplitúdója növekszik a tárolás folyamán, a frissen izolált tilakoidokban mérhető 5%-ról 12 hét alatt 41%-ra, 20 hét alatt 64%-ra. Az S_3 állapotnál hasonló eredmény adódik. Ez annyit jelent, hogy – mivel a gyors fázis relatív amplitúdója a redukált Tir-D mennyiségével arányosnak tekinthető – az "átfordult" mintákban jelentős mennyiségű redukált Tir-D van jelen.



10. ábra. Az S_2 állapot lecsengése különböző ideig -70°C hőmérsékleten tárolt izolált spenót tilakoidokban. Frissen izolált tilakoidok (a); 12 hétig (b) és 20 hétig (c) tárolt tilakoidok. Az S_2 relatív mennyiségét az "Anyagok és módszerek"-ben (4.3.) leírtak szerint határoztuk meg.

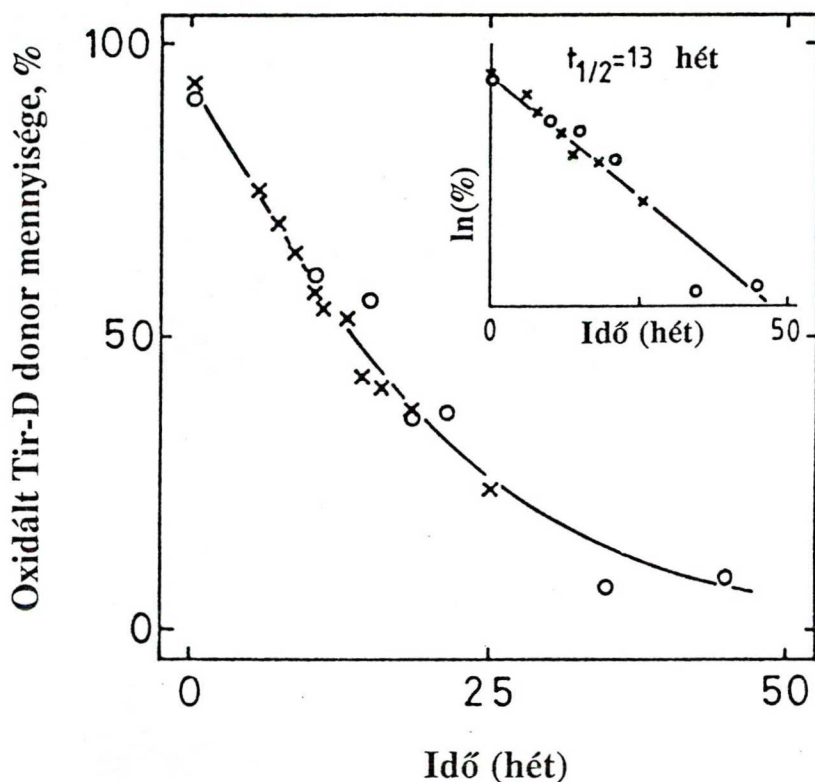
A Tir-D⁺ –70°C hőmérsékleten való tárolás folyamán történő redukcióját ESR mérésekkel közvetlenül bizonyítottuk. A Tir-D oxidált formájából egy karakterisztikus ESR jel ered, az ún. Signal II_{slow}. Ezen jel amplitúdója jelentősen csökken a –70°C hőmérsékleten történő tárolás folyamán (11. ábra, folyamatos vonal). Ha a mintát –75°C-on megvilágítjuk, majd szobahőmérsékleten néhány percig sötétadaptáljuk, azt tapasztaljuk, hogy a Signal II_{slow} amplitúdója a kontroll értéket megközelítő mértékűre emelkedett (11. ábra, szaggatott vonal). Ezen a hőmérsékleten gátolt a Q_A és Q_B elektronakceptorok közötti átmenet (Joliot, 1974), így a megvilágítás csak az S₁ → S₂ átmenetet tudja elősegíteni. A képződött S₂ pedig a szobahőmérsékletű tárolás alatt oxidálni tudja a Tir-D-t.

Az S₂, S₃ állapotok lecsengésében a gyors fázis ezen állapotok és Tir-D közötti töltésátadásnak tulajdonítható, amit olyan kinetikai ESR mérések eredményei támasztanak alá, melyben egyetlen lézerpulzus által indukált Tir-D oxidáció kinetikáját követjük nyomon a Signal II_{slow} alacsony tér oldali csúcsának detektálásával. A Signal II_{slow} növekedése egyfázisú kinetikát mutat, a felfutás félideje 1.9 s (11. ábra, inzert). Ez az eredmény jó egyezést mutat korábbi irodalmi adatokkal (Babcock és Sauer, 1973; Velthuys és Visser, 1975) és az S₂, S₃ állapotok lecsengéséből meghatározott, a gyors fázishoz rendelt félidőkkel is.



11. ábra. A Signal II_{slow} ESR spektruma különböző ideig –70°C hőmérsékleten tárolt izolált spenót tilakoidokban. Frissen izolált tilakoidok (a); 12 hétig (b) és 20 hétig (c) tárolt tilakoidok. Az ESR spektrumot sötétben (folyamatos vonal) ill. 3 perces –75°C hőmérsékletű megvilágítás, majd az ezt követő 3 perces szobahőmérsékletű sötétadaptálás után (szaggatott vonal) detektáltuk. Az inzert a Signal II_{slow} kialakulásának szobahőmérsékleten egyetlen lézerpulzussal indukált kinetikáját mutatja 20 hétig tárolt tilakoidok esetén.

A Tir-D⁺ redukciójának félideje meghatározható egyrészt az S₂ állapot lecsengésében a lassú fázis relatív amplitúdójából, másrészt a Signal II_{slow} mindenkoros amplitúdójának a szobahőmérsékleten elővilágított mintában mérhetővel történő összehasonlításából. Eredményül adódott, hogy a Tir-D⁺ redukciójának félideje –70°C hőmérsékleten kb. 13 hét (12. ábra).



12. ábra. A Tir-D⁺ lecsengése a –70°C hőmérsékleten történő tárolás idejének függvényében. A Tir-D⁺ mennyiségét egyrészt az S₂ állapot lecsengésében a lassú fázis relatív amplitúdójából (○), másrészt a sötétben mért Signal II_{slow} amplitúdójának a szobahőmérsékleten megvilágított, majd 5 percig sötétadaptált minta Signal II_{slow} amplitúdójához való viszonyából (×) határoztuk meg.

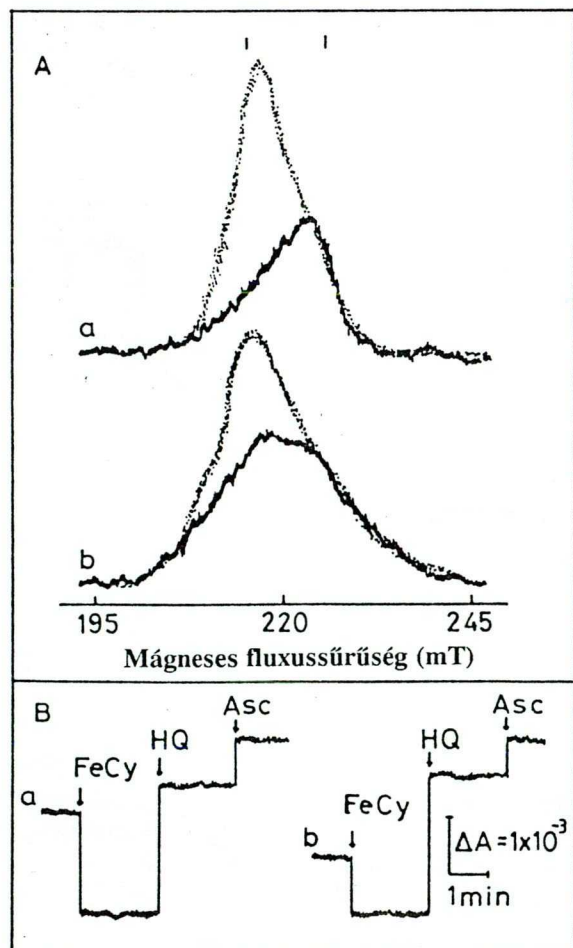
A kérdés ezek után az, hogy mely redukáló komponens lép kölcsönhatásba az oxidált állapotú Tir-D-vel az alacsony hőmérsékletű tárolás folyamán.

Egyik lehetőség a redukált Q_A kinon akceptor. Kawamori és munkatársai (1987) megállapították, hogy a Signal II_{slow} nem sötétadaptált kloroplasztiszokban kétfázisú kinetikát mutatva lecseng. A lecsengéseket –196°C hőmérsékleten mérték. A lecsengés gyorsabb fázisának félideje kb. 5 nap, relatív amplitúdója 60%, a lassúbb fázisé kb. 54 nap (ez a érték erősen függ a minta elkészítésétől), relatív amplitúdója 40%. A gyors fázis a Tir-D⁺ és Q_A[–] közötti töltésrekombináció következménye. A mi esetünkben azonban a Tir-D⁺ és Q_A[–] közötti töltésrekombináció lehetősége nem

kielégítő magyarázat a redukált Tir-D megnövekedett mennyiségére, mivel a mérésekhez sötétben előkészített tilakoidokban elhanyagolható a Q_A^- mennyisége.

Másik lehetőségként a következőket említhetjük meg. Rövid ideig (kb. 3-5 perc) tartó sötétadaptálás után a centrumok 25%-a S_0 állapotban van. Az ESR és az oxigén mérésekhez a -70°C -on tárolt minták előkészítése kb 10 percet vesz igénybe. Ezen idő alatt az $S_0 \rightarrow S_1$ konverzió révén, melynek félideje szobahőmérsékleten 10-15 perc (Styring és Rutherford, 1987; Vass és mtsai, 1990), a centrumok 10-15%-ában redukálódik a Tir-D. A -70°C hőmérsékleten történő tárolás alatt azonban a Tir-D a centrumok jóval több mint 10-15%-ában redukálódik, tehát további redukáló partnert kell felfedni.

További lehetőségként az irodalomból ismert, hogy a redukált citokróm *b*-559 alacsony hőmérsékletű megvilágítás esetén az oxidált reakciócentrum klorofill elektrondonorja (De Paula és mtsai, 1985; Vermeiglio és Mathis, 1973). Annak a megválaszolására, hogy mi történik a citokróm *b*-559-cel a -70°C hőmérsékletű tárolás alatt, nyomon követtük a citokróm *b*-559 redoxváltozásait ESR és optikai mérésekkel (13. ábra).



13. ábra. Az izolált tilakoidok -70°C hőmérsékletű tárolásának hatása a citokróm *b*-559 redox állapotára. A: Az oxidált citokróm *b*-559 ESR spektruma ($g_z \approx 3$) frissen izolált tilakoidok (a) ill. -70°C hőmérsékleten 20 hétig tárolt tilakoidok (b) esetén. Folyamatos vonal jelöli a sötétben tartott, szaggatott vonal jelöli a -196°C hőmérsékleten 20 percig megvilágított minta ESR spektrumát. A vonalkák (|) a $g \approx 2.94$ (224.5 mT) és a $g \approx 3.05$ (216.5 mT) értékeket jelölik. B: A citokróm *b*-559 redox állapotának optikai vizsgálata az 559 és 570 nm közötti abszorpció különbség változásának mérésével frissen izolált tilakoidok (a) ill. 20 hétig -70°C hőmérsékleten tárolt tilakoidok esetén (b). A mintához egymás után 1 mM ferricianidot (FeCy), 5 mM hidrokinont (HQ) és 4 mM nátrium-askorbátot (Asc) adtunk.

A citokróm *b*-559 oxidált alacsony potenciálú formája ESR jelet eredményez $g \approx 2.94$ körüli csúccsal (13. ábra, A, a görbe, folyamatos vonal). Ha a tilakodidokat -196°C hőmérsékleten megvilágítjuk, akkor a citokróm *b*-559 ESR jele megnő, a jel csúcsa $g \approx 3.05$ körüli lesz a citokróm *b*-559 magas potenciálú formájának oxidálódása eredményeképpen (13. ábra, A, a görbe, szaggatott vonal). A -70°C hőmérsékletű tárolás során az ESR jel csúcsa szintén a magasabb g értékek felé tolódik (13. ábra, A, b görbe, folyamatos vonal) jelezvén, hogy a citokróm *b*-559 magas potenciálú formája ez esetben is oxidálódott bizonyos mértékben. Ugyanezt mutatják az optikai mérések is. A frissen izolált tilakoidokban a citokróm *b*-559 magas potenciálú – hidrokinnal redukálható (Bendall és Rolph, 1987) – formája jórészt redukált állapotban van és ferricianiddal oxidálható (13. ábra, B, a görbe). Az alacsony hőmérsékletű tárolás során csökken a ferricianiddal oxidálható frakció (13. ábra, B, b görbe), ami azt jelenti, hogy a citokróm *b*-559 bizonyos hányada oxidálódott a tárolás alatt.

Az ESR és az optikai mérések kiértékelése – egymással összhangban – a következő eredményt adta. A -70°C hőmérsékletű tárolás folyamán 20 hét alatt a citokróm *b*-559 teljes mennyiségének kb. 25%-a, a magas potenciálú formának kb. 40%-a oxidálódott. Figyelembe véve, hogy az irodalmi adatok szerint egy reakciócentrumban kettő citokróm *b*-559 molekula (De Paula és mtsai, 1985; Lam és mtsai, 1983) és csak egy Tir-D (Debus és mtsai, 1988a; Vermaas és mtsai, 1988; Franzen és mtsai, 1986) van, a fenti adatok azt mutatják, hogy a citokróm *b*-559 25%-ának oxidációja a Tir-D⁺ 50%-ának redukálódásáért felelős. A -70°C hőmérsékleten 20 hét alatt azonban a Tir-D⁺-nak kb. 65%-a redukálódik. A fennmaradó 10-15%-ot a vízbontó rendszer S_0 állapota redukálja a méréseket megelőző kb. 10 perc sötétadaptálás alatt.

5.6. Az S_2 , S_3 állapotok lecsengésének hőmérsékletfüggése

Az $S_2 \rightarrow S_1$ és az $S_3 \rightarrow S_2$ lecsengéseket alkotó folyamatokról további információkat nyerhetünk a lecsengések hőmérséklettől való függésének vizsgálatával. A 8°C és 36°C hőmérséklet tartományban kapott eredményeinket a 4. táblázatban foglaltuk össze. Ebből látható, hogy az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében mind a lassú, mind a gyors fázis félideje erősen függ a hőmérséklettől. A hőmérséklet növelésével a reakciók felezési ideje csökken, sebességi állandója nő. Az egyes fázisok felezési idejét kisebb hibával tudjuk meghatározni abban az esetben, ha a fázisoknak közel azonos a relatív amplitúdója. Az "átfordult" minta rendelkezik ezzel a tulajdonsággal, ezért az S_2 , S_3 állapotok lecsengésének hőmérsékletfüggését ezeken a mintákon tanulmányoztuk.

4. táblázat. Az S_2 S_3 állapotok lecsengésében a lassú ill. a gyors fázis felezési idői különböző hőmérsékleteken.

Hőmérséklet (°C)	Felezési idő (s)			
	S_2, S	S_3, S	S_2, F	S_3, F
8.6	128.0	238.0	5.0	3.9
15.0	67.3	108.4	2.2	2.1
23.7	28.9	46.9	1.4	1.6
28.5	22.2	24.5	0.9	1.1
32.0	15.7	19.2	0.9	0.9
38.5	15.1	12.2	0.7	0.6

A táblázatban az S_2 S_3 állapotok alsó indexében az S (slow) ill. F (fast) betűk a lassú ill. a gyors fázisra utalnak.

A sebességi állandók hőmérsékletfüggésének mérésével egy fontos energetikai jellemzőt tudunk meghatározni, az aktiválási energiát. Kémiai reakciók során a kiindulási anyagokból egy átmeneti állapot kialakulása után jönnek csak létre a végtermékek. Ezt a közbenső rendszert aktivált komplexnek nevezik és potenciális energiája mind a kiindulási anyagok, mind a végtermékek potenciális energiájánál nagyobb. Aktiválási energiának (E_a) a kiindulási anyagok és az aktivált komplex potenciális energiája közötti különbséget nevezzük. Ez az a minimális energia, amely szükséges ahhoz, hogy a rendszerben a reakció az adott átmeneti állapoton keresztül végbemenjen.

A sebességi állandó és a hőmérséklet közötti összefüggés leírására Svante Arrhenius a következő egyenletet javasolta:

$$k = \sigma A \exp(-E_a/kT),$$

ahol A az adott reakcióra jellemző állandó, σ a térszerkezetre jellemző faktor, amely a reagáló molekulák alakjától és orientációjától függ, E_a az aktiválási energia, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet. A sebességi állandó és a felezési idő közötti összefüggés:

$$k = \ln 2 / t_{1/2}.$$

Ezzel az Arrhenius féle egyenlet:

$$t_{1/2} = (\ln 2 / \sigma A) \exp(E_a/kT).$$

Legyen $c = \ln 2 / \sigma A$. Ekkor

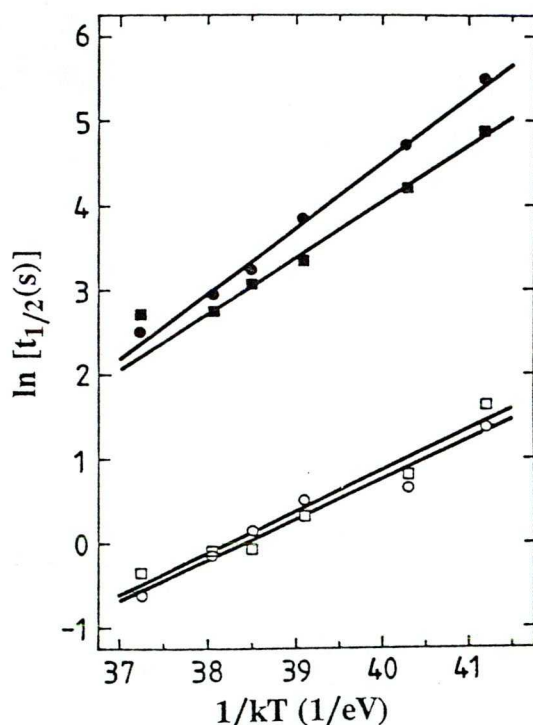
$$t_{1/2} = c \exp(E_a/kT).$$

Az egyenlet mindkét oldalának logaritmusát véve a következő egyenlethez jutunk:

$$\ln t_{1/2} = \ln c + E_a/kT.$$

Az $1/kT$ függvényében ábrázolva az $(\ln t_{1/2})$ -t egyenest kapunk, melynek meredeksége E_a .

A fenti műveletet elvégezve a 4. táblázat adataival a 14. ábrán látható eredményt kapjuk. Az S_2 , S_3 állapotok és a redukált Tir-D donor közötti töltésátadás aktiválási energiája rendre 0.49 eV, 0.46 eV ($\square$, $\circ$). A lassú fázist okozó folyamatok aktiválási energiái 0.66 eV, 0.77 eV rendre az S_2 , S_3 állapotoknál ($\blacksquare$, $\bullet$).

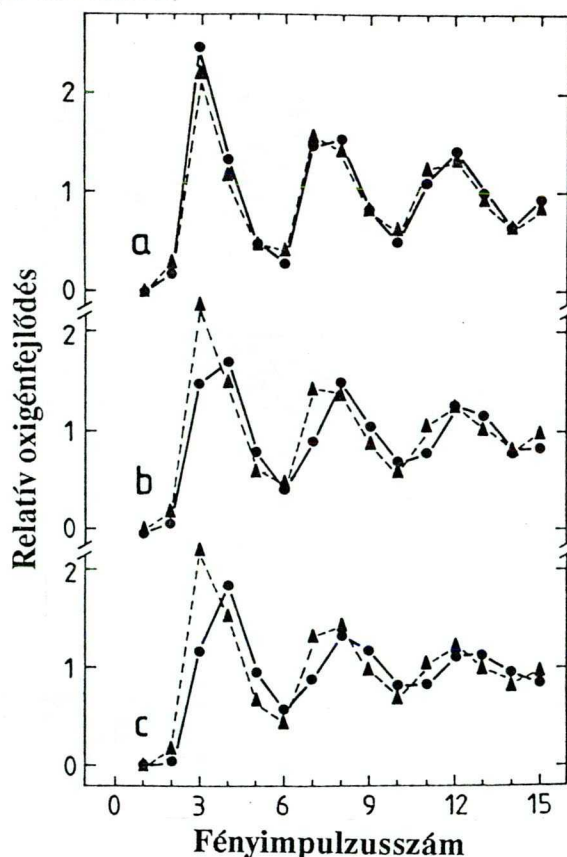


14. ábra: Az S_2 és S_3 állapotok lecsengésében az egyes fázisok félidejének logaritmusai az $1/kT$ függvényében. Az egyenesek meredeksége az aktiválási energiát határozza meg. A szimbólumok a következők: ($\blacksquare$), ($\bullet$) rendre az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a lassú fázis félidejének a logaritmusai; ($\square$), ($\circ$) rendre az S_2 , S_3 gyors fázis félidejének a logaritmusai.

Inui és munkatársai (1989) ESR mérésekből meghatározták a Tir-D és a Mn komplex közötti töltésátadás aktiválási energiáját, ami 0.17 eV-nak adódott, 0.3 eV-tal kisebbnek az általunk meghatározott értéknél. Az eltérés oka lehet az, hogy az ESR mérésekhez nem izolált tilakoidokat használtak, hanem olyan preparátumokat, melyek csak a második fotokémiai rendszert tartalmazzák. A kétféle minta elkészítésének, kémiai kezelésének eltérése előidézhet olyan változásokat, melyek következtében a töltésátadás más közbülső állapotokon keresztül megy végbe, ami különböző aktiválási energiát jelent.

Termolumineszcencia mérésekből meghatározható az S_2 , S_3 állapotok és az egyszerűen redukált másodlagos akceptor (Q_B^-) közötti töltéssrekombináció aktiválási energiája: 0.7-1.0 eV (Vass és mtsai, 1981; Vass és mtsai, 1987c), ami jó egyezést mutat eredményeinkkel.

A hőmérséklet növelésével a gyors fázis felezési ideje csökken, a redukált Tir-D és az S_2 , S_3 állapotok közötti töltésátadás sebessége nő. Ha az "átfordult" mintákon különböző hőmérsékleteken és azonos gerjesztő fényimpulzus frekvencia mellett megmérjük az oxigénkiválasztást, az oxigén szekvenciák alakjának változásában nyomon követhetjük a hőmérsékletnek a fenti töltésátadásra gyakorolt hatását. A mérések eredményeit a 15. ábra mutatja. A folyamatos vonallal jelölt elővilágítás nélküli oxigén szekvenciákban a hőmérséklet növelésekor az első oxigén maximum a harmadik fényimpulzusról a negyedikre fordul. A hőmérséklet növelésével a Tir-D donortól az S_2 , S_3 állapotokhoz történő elektronátadás egyre gyorsabb lesz. Az egyre gyorsabb folyamat számára a fényimpulzusok közötti 1 s periódusidő relatíve egyre hosszabb lesz, mind nagyobb mértékben történhetnek meg az $S_2 \rightarrow S_1$, $S_3 \rightarrow S_2$ reakciók, így a látszólagos S_0 populáció (a negyedik impulzus után mért oxigén mennyisége) is egyre nagyobb lesz. A szaggatott vonallal jelölt oxigén szekvenciákban elővilágításként 1 Hz frekvenciájú, 50 impulzusból álló sorozatot alkalmaztunk. Ez az elővilágítás a Tir-D donort oxidálja, így a hőmérséklet növelésekor az első oxigén maximum nem fordul át a harmadik impulzusról a negyedikre. Hőmérséklettől függetlenül az első maximum a harmadik impulzusra jelentkezik. A Kok modell segítségével meghatározott látszólagos S_0 értékek hűen tükrözik a 15. ábrán látható változásokat, mely értékeket a "miss" paraméter értékeivel együtt az 5. táblázatban foglaltuk össze.



15. ábra. "Átfordult" minta oxigén szekvenciái 1 Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozat mellett különböző hőmérsékleteken elővilágítás nélkül (●—●), ill. ha elővilágításként 50 fényimpulzusból álló 1 Hz frekvenciájú sorozatot alkalmaztunk (▲---▲). Az a, b, c görbék esetén a hőmérséklet rendre 8°C, 25°C és 35°C.

5. táblázat. A Kok modellből meghatározott látszólagos S_0 és "miss" értékek különböző hőmérsékleteken elővilágítás nélküli (–) ill. elővilágított (+) "átfordult" minták esetén.

Hőmérséklet (°C)	Elővilág. –		Elővilág. +	
	S_0	Miss	S_0	Miss
8	0.22	0.11	0.25	0.10
25	0.51	0.13	0.23	0.13
35	0.63	0.15	0.22	0.15

A hőmérséklet növelésével a "miss" faktor értéke is nő. Az oxigén szekvenciák alakjánál ez abban mutatkozik meg, hogy magasabb hőmérsékleten az oszcilláció mélysége kisebb, hamarabb kialakul az egyensúlyi állapot. A "miss" faktor eredetére nézve még nincs egységesen elfogadott álláspont az irodalomban. Egyes elképzelések szerint az S_2 , S_3 és a redukált elsődleges elektron akceptor (Q_A^-) közötti töltésrekombináció – mely folyamat félideje késleltetett lumineszcencia ill. termolumineszcencia mérésekből meghatározható és értéke kb. 1-2 s (Hideg, 1987; Demeter és Vass, 1984) – lejátszódhat az egyes fényimpulzusok közötti időben. Mivel ez az S állapotok számára visszalépést jelent, az oxigénkiválasztásban "miss"-ként jelentkezik. A hőmérséklet növelésével ez a rekombinációs folyamat is felgyorsul és így megnövelheti a "miss" értékét.

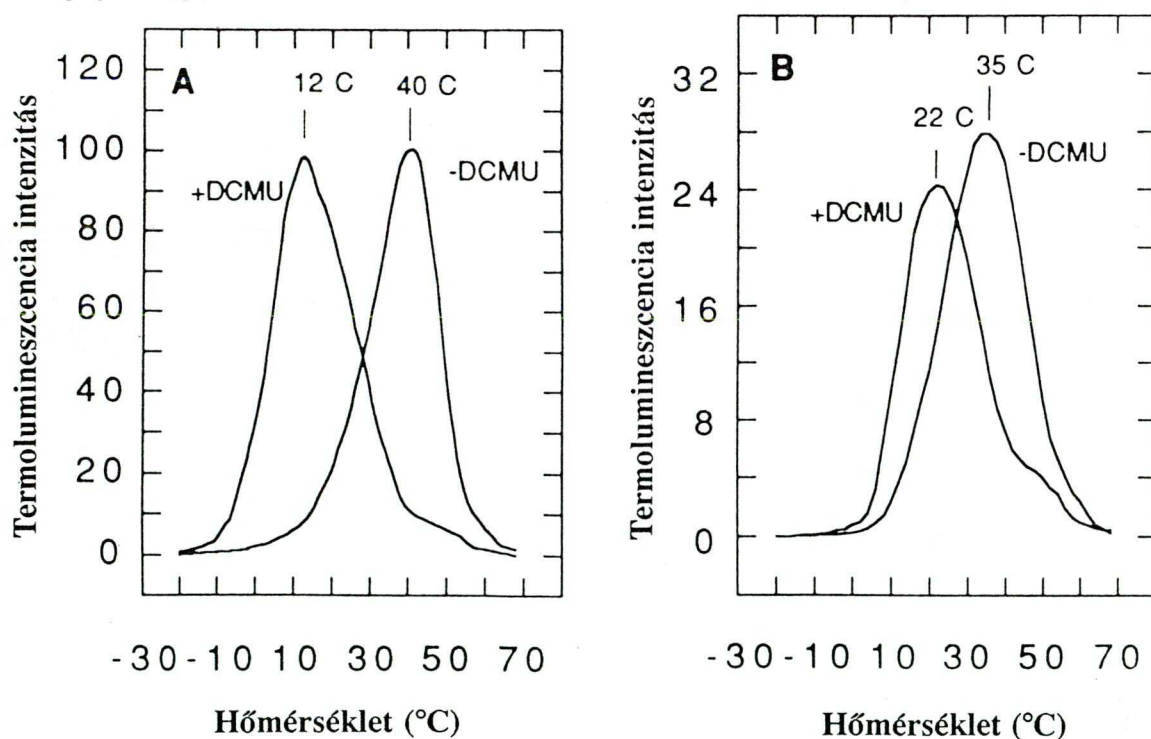
5.7. A 33 kDa-os protein szerepének vizsgálta

A *psbO* gén által kódolt 33 kDa-os vízdékony periferiális protein szoros összefüggésben áll a vízbontásért felelős katalitikus Mn csoporttal, szerepének pontos megismerése azonban további vizsgálatokat igényel.

Az irodalmi áttekintés 2.2. pontjában említett *in vitro* kísérletek mellett *in vivo* vizsgálatok is történtek. Ezek egy része a 33 kDa-os protein elengedhetetlen voltát bizonyította az *in vivo* vízbontásban (Philbrick és Zilinskas, 1988; Mayfield és mtsai, 1987). Cianobaktériumokból azonban olyan mutánsokat is sikerült előállítani, melyekből hiányzott a *psbO* gén, és amelyek ennek ellenére képesek voltak fotoautotróf körülmények között nőni és oxigént fejleszteni, bár alacsony intenzitással (Burnap és Sherman, 1991; Philbrick és mtsai, 1991), valamint igen érzékenyen reagáltak a magas fényintenzitással történő megvilágításra (Mayes és mtsai, 1991).

Vizsgálatainkat Mayes és munkatársai (1991) által előállított *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium IC2 mutánsán végeztük, melyből delécióval távolították el a 33 kDa-os proteint kódoló *psbO* gént. Termolumineszcencia és fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés méréseket végeztünk a vad típusú és mutáns sejteken a 33 kDa-os protein szerepének pontosabb megismerése céljából.

A PSII akceptor oldalán a Q_A és Q_B elektronakceptorokon stabilizált negatív töltések valamint a donor oldali vízbontó komplex S_2 és S_3 állapotaiban stabilizált pozitív töltések rekombinációja karakterisztikus termolumineszcencia sávok létrejöttét eredményezi (összefoglalásként ld.: Sane és Rutherford, 1986; Vass és Inoue, 1991). Sötétadaptált tilakoidok egy fényimpulzussal történő gerjesztése az ún. B sávot hozza létre, mely az $S_2Q_B^-$ töltéspárból ered, csúcshőmérséklete 30-40°C közötti. Ha a Q_A és Q_B közötti elektrontranszportot gátoljuk, akkor a keletkező ún. Q sáv az $S_2Q_A^-$ töltéspár rekombinációjából származik, csúcshőmérséklete 5-15°C. A termolumineszcencia sávok intenzitása a rekombinálódó töltéspárok mennyiségével arányos, a sáv csúcsának hőmérséklete pedig a töltéspárok energetikai jellemzőiről ad információt (Vass és mtsai, 1981).

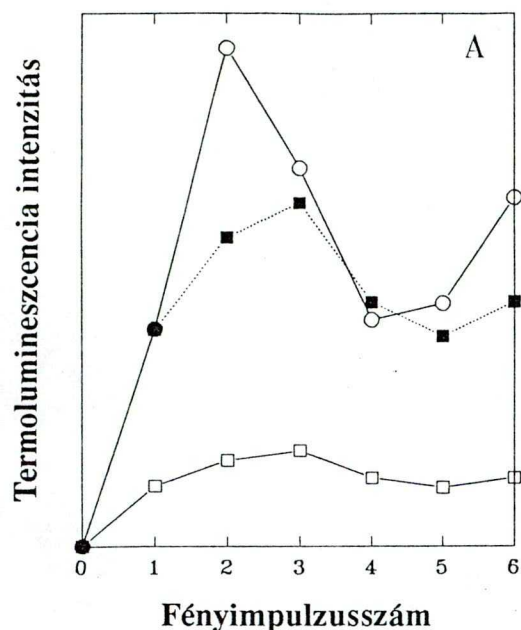


16. ábra. A *psbO* gén deléciójának hatása a *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium fényimpulzussal gerjesztett termolumineszcencia sávjaira. A méréseket az "Anyagok és módszerekben" (4.7.) leírtak szerint végeztük a *Synechocystis* sp. PCC 6803 vad típusú (A) és IC2 mutáns (B) sejtein. A DCMU koncentrációja 50 μ M volt.

A *Synechocystis* sp. PCC 6803 vad típusában az egy fényimpulzussal indukált B termolumineszcencia sáv csúcsa 40°C-nál van, míg a DCMU jelenlétében mérhető Q sáv 12°C-nál (16. ábra, A). A 33 kDa-os proteint nem tartalmazó IC2 mutánsban is jelen vannak ezek a termolumineszcencia sávok, de intenzitásuk csak 25-30%-a a vad típusénak azonos klorofill koncentráció mellett (16. ábra, B). Továbbá a csúcsok helyzete sem azonos a vad típusával: a mutánsban a B sáv csúcshőmérséklete 35°C (16. ábra, B); a Q sáv csúcshőmérséklete 22°C (16. ábra, B), azaz 10°C-kal magasabb a vad típus megfelelő értékénél.

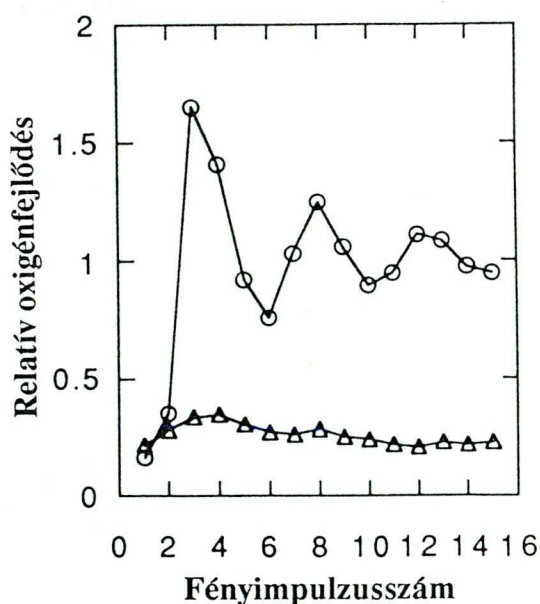
A termolumineszcencia sáv csúcsának magasabb hőmérsékletek felé történő eltolódása a rekombinációban résztvevő töltéspár stabilitásának növekedését jelenti. A fenti eredmények így azt mutatják, hogy a 33 kDa-os protein nélkül az $S_2Q_A^-$ töltéspár stabilitása megnő a vad típushoz képest, míg az $S_2Q_B^-$ töltéspár stabilitása közel megegyező a mutánsban és a vad típusban. A két töltéspárban azonos a pozitív töltést hordozó komponens, a vízbontó rendszer S_2 állapota, míg a negatív töltés különböző komponenseken, a Q_A és a Q_B kinon akceptorokon található. Levonható tehát az az igen érdekes következtetés, hogy a 33 kDa-os protein hiánya változásokat idézhet elő a PSII akceptor oldalán, azaz a reakciócentrum lumen felőli oldalán található perifériális protein is lehet hatással a reakciócentrum sztrómához közeli tartományában kötődő redox komponensekre. Hasonlóan *in vivo* eredményeinkhez a 33 kDa-os protein hiánya *in vitro* rendszerekben is megnövelte az $S_2Q_A^-$ és változatlanul hagyta az $S_2Q_B^-$ töltéspár stabilitását (Vass és mtsai, 1987a; Vass és mtsai, 1987b). Az irodalomban további adatok találhatóak arra vonatkozóan, hogy a 33 kDa-os protein milyen összefüggésben van a PSII reakciócentrum D1 ill. D2 proteinjével (Mei és mtsai, 1989), a Q_B helyére kötődő mesterséges elektronakceptorok kötőhely iránti affinitásával (Ono és Inoue, 1986), és a CP47 klorofill kötő fehérje konformációjával (Burnap és Sherman, 1991). Eredményeink tehát tovább erősítik azt az elképzelést, hogy a 33 kDa-os perifériális protein szerepet játszik a PSII optimális konformációjának fenntartásában.

Ha rövid ideig sötétadaptált tilakoidban a termolumineszcenciát nem egy, hanem kettő, három stb fényimpulzussal gerjesztjük, akkor a B termolumineszcencia sáv intenzitása négyes periódussal oszcillál, a maximumok kettő, hat stb. fényimpulzus után jelentkeznek. Egynél több fényimpulzussal történő gerjesztés esetén a B sáv kialakításában az S_2 állapot mellett az S_3 is résztvesz, és az oszcilláció a vízbontó komplex redox ciklusát tükrözi (összefoglalásként ld.: Sane és Rutherford, 1986; Vass és Inoue, 1991). A *Synechocystis* sp. PCC 6803 vad típusában a B sáv oszcillációja a fentebb leírtaknak megfelelő, ellenben a mutáns sejtek esetén az oszcilláció erősen csillapított és az első maximum csak a három fényimpulzussal történő gerjesztés után jelentkezik (17. ábra).



17. ábra. A *psbO* gén deléciójának hatása a *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium *B* termolumineszcencia sávjának fényimpulzusokkal indukált oszcillációjára. A méréseket az "Anyagok és módszerekben" (4.7.) leírtak szerint végeztük a *Synechocystis* sp. PCC 6803 vad típusú (○) és IC2 mutáns (□) sejtjein. A mutáns sejtek *B* termolumineszcencia sávjának oszcillációját normált értékekkel is feltüntettük (■): a mutáns sejtek egy fényimpulzussal gerjesztett *B* termolumineszcencia sáv intenzitását normáltuk a vad típus ugyanezen értékéhez.

A vízbontó rendszer S állapotairól további információkhoz juthatunk a fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés mérésével. A *Synechocystis* sp. PCC 6803 vad típusa a jól ismert karakterisztikus négyes periódusú oszcillációt mutatja (18. ábra, ○). A 33 kDa-os proteint nélkülöző mutáns sejtek oxigén szekvenciája azonban nagymértékben csillapított és a steady state értéke is rendkívül alacsony (18. ábra, Δ). Mind a vad típusnál, mind a mutáns sejteknél megfigyelhető, hogy az oxigén szekvencia egy fényimpulzusra kapott értéke – a magasabb rendű növényektől eltérően – nem zérus. Ez azonban nem oxigénfejlődés eredménye, hanem egy ismeretlen eredetű elektrokémiai jel (Bader és mtsai, 1983; Cao és mtsai, 1991).



18. ábra. A *psbO* gén deléciójának hatása a *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium fényimpulzusokkal gerjesztett oxigénfejlődésére a vad típusú sejtek (○) és a mutáns sejtek (Δ) esetén. A fényimpulzus sorozat frekvenciája 1 Hz volt.

A Clark típusú elektróddal 2,5-dimetil-p-benzokinon és ferricianid, mint mesterséges elektronakceptor rendszer jelenétében mért folyamatos oxigénfejlődés értéke a mutáns sejtekben mindössze kb. 30%-a volt a vad típusénak, mely eredmény egyezik az irodalmi adatokkal (Burnap és Sherman, 1991; Philbrick és mtsai, 1991; Mayes és mtsai, 1991).

Összefoglalva a termolumineszcencia sávok intenzitásában valamint a "steady state" oxigén értékekben tapasztalt különbségeket láthatjuk, hogy a 33 kDa-os proteint nem tartalmazó mutáns sejtek mindössze 25-30%-át mutatják a vad típusban mérhető jeleknek. Ez azt jelenti, hogy a mutáns sejtekben a vízbontó rendszereknek csak kisebb hányadában fut végig az S állapotok redox ciklusa. *In vitro* kísérleti eredmények ezt alá is támasztják (Ono és Inoue, 1985): a 33 kDa-os protein eltávolítása két Mn atom elvesztését okozza a négyatomos Mn csoportból a termolumineszcencia sávok intenzitásának egyidejű csökkenése mellett, ha az ionkoncentráció fiziológiás szintű.

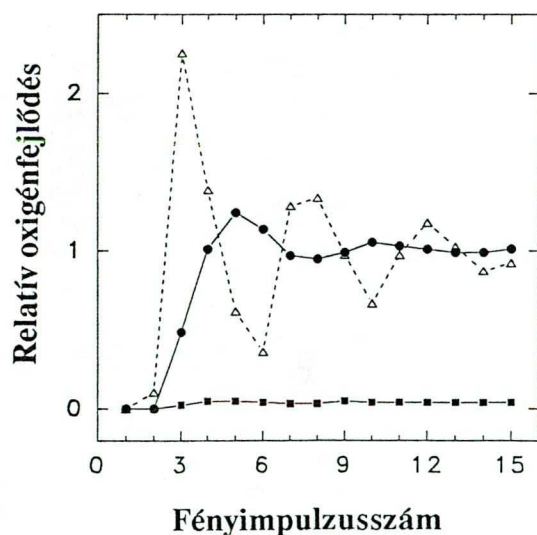
A fényimpulzus sorozattal gerjesztett termolumineszcencia és oxigénfejlődés mérések eredményeként kapott oszcillációk nagyfokú csillapodást mutatnak a mutáns sejtekben. A termolumineszcencia sávok intenzitásában ez a csillapodás különösen kifejezetté válik a kettő ill. nagyobb számú fényimpulzus sorozattal való gerjesztés után. Ebből arra gondolhatunk, hogy *in vivo* a magasabb S állapotok közötti átmenetek ($S_2 \rightarrow S_3$ és $S_3 \rightarrow S_0$) hatékonysága csökkent. A 33 kDa-os protein szerepére irányuló *in vitro* kísérletek eredménye a Cl^- koncentráció függvényében más és más volt. A perifériális protein hiányában magas Cl^- koncentráció mellett szintén az $S_2 \rightarrow S_3$ és az $S_3 \rightarrow S_0$ átmenetek szenvedtek károsodást (Miyao és mtsai, 1987; Miyao és Murata, 1984), míg fiziológiás Cl^- koncentráció esetén az $S_3 \rightarrow S_0$ átmenet teljes gátlását tapasztalták (Miyao és Murata, 1984; Ono és Inoue, 1985). Az *in vivo* és az *in vitro* kísérletek különbözőségére kétféle magyarázat lehetséges. Az egyik, hogy a 33 kDa-os protein eltávolításánál alkalmazott eljárás a vízbontó rendszer további károsodását okozza. A másik, hogy az intakt *Synechocystis* sp. PCC 6803 sejtekben a Cl^- és Ca^{2+} koncentrációk szokatlanul magasak. Ez utóbbi mellett szól az az eredmény, hogy a Ca^{2+} elvonás kísérlet körülményei között a mutáns sejtek nem tudtak növekedni, míg a vad típus növekedése nem változott (Philbrick és mtsai, 1991).

Összefoglalva az eddigieket elmondhatjuk, hogy a *psbO* gén termékét, a 33 kDa-os perifériális proteint nélkülöző *Synechocystis* sp. PCC 6803 sejtekben a vízbontó komplexek bizonyos hányada nem működik, a fennmaradóakban megtörténik ugyan a víz oxidációja, bár a magasabb S állapotok kialakulása hátráltatott.

5.8. A ftoheterotróf nevelési körülmények hatása a *Chlamydomonas stellata* zöld alga oxigénfejlődésére

A fényimpulzusokkal gerjesztett oxigénfejlődés mérések alkalmazhatóságának egyik példája az autotróf ill. ftoheterotróf körülmények között nevelt *Chlamydomonas stellata* zöld alga vizsgálata. A módszer segítségével az oxigénfejlődés nem csak mennyiségileg mérhető, de minőségi változásai is nyomon követhetők a különböző növekedési körülmények között.

Az obligát ftoheterotróf *Chl. stellata* CO₂ mentes atmoszférában szénforrásként acetátot hasznosítva nem mutat fotoszintetikus oxigénfejlődést. Továbbá a ftoheterotróf sejtekben a citokróm *f* fotoredukciója lelassul és a PSII fluoreszcenciája erősen lecsökken (Wiessner and Fork, 1970; Wiessner and French, 1970). Az irodalomban általánosan elfogadott álláspont szerint a vízbontó rendszer és a P₆₈₀ közötti elektrontranszport gátlása a PSII fluoreszcenciájának csökkenését eredményezi (Duysens és Sweers, 1963). Ennek alapján Wiessner és munkatársai (1981) feltételezték, hogy a *Chl. stellata* ftoheterotróf alga alacsony PSII fluoreszcenciáját az acetát jelenlétében kialakuló donor oldali elektrontranszport gátlása okozza (Wiessner és mtsai, 1981). A alább ismertett kísérleti eredmények azonban arra engednek következtetni, hogy a ftoheterotróf nevelési körülmények nem károsítják a vízbontás mechanizmusát a *Chl. stellata* zöld algában.



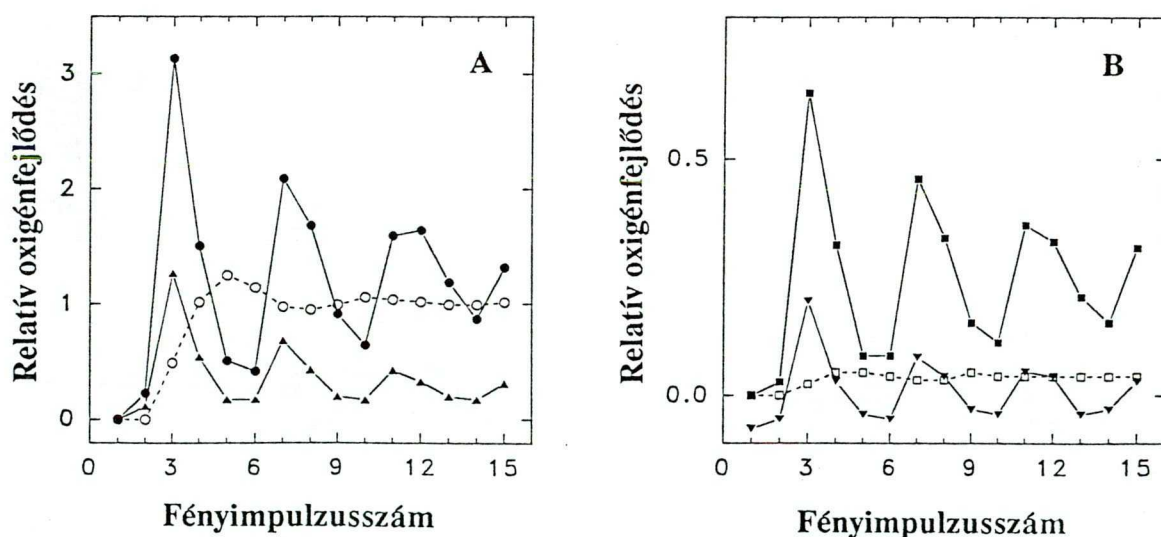
19.ábra. Fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés autotróf (●---●) és ftoheterotróf (■—■) *Chlamydomonas stellata*, valamint autotróf *Chlamydomonas reinhardtii* (Δ---Δ) sejtekben.

A ftoheterotróf *Chl. stellata* fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődése alig észlelhető (19. ábra, ■—■), mindössze kb 5%-a az autotróf alga esetében mért értéknek. Azonban az autotróf alga oxigén szekvenciája sem mutatta a megszokott képet. Az adott mérési körülmények mellett az oxigén szekvencia nem mutat négyes periódusú oszcillációt, hanem igen erős csillapodással viszonylag gyorsan éri el a "steady state" értéket (19. ábra, ●---●). A mérési körülmények ellenőrzéséül a *Chlamydomonas reinhardtii* algasejteken végzett kísérletek szolgáltak. Ezek eredménye a szokásos kezdeti és átmeneti paraméterekkel bíró négyes periódusú oszcilláció volt (19. ábra, Δ---Δ).



A *Chl. stellata* oxigén szekvenciája jelentősen megváltozik DCQ mesterséges elektronakceptor jelenlétében. Az autotróf módon nevelt alga fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődése a karakterisztikus négyes periódussal oszcillál (20. ábra, A, ●—●), a "steady state" értéke kb. 25%-kal nagyobb a kezeletlen minta értékénél. Az igazán figyelemre méltó eredményt a ftoheterotróf alga mutatja. Itt a "steady state" érték mintegy ötszörösére nő a mesterséges elektronakceptoroknak köszönhetően és a jól ismert négyes periódusú oszcilláció sem hiányzik (20. ábra, B, ■—■). Az S állapotok kezdeti eloszlása valamint az átmeneti valószínűségek közel azonosnak adódnak az autotróf és a ftoheterotróf módon nevelt *Chl. stellata*-t összehasonlítva. A ftoheterotróf alga oxigén szekvenciájának "steady state" értéke azonban a mesterséges elektronakceptorok jelenlétében is csak negyede az autotróf algában mért ugyanezen értéknek.

Érdekes eredmény mutatnak a DCMU és DCQ egyidejű jelenlétében elvégzett mérések. A DCMU 0.5 μM végkoncentrációban szinte teljes mértékben megszünteti az oxigénfejlődést. Ha azonban a DCMU mellett a DCQ is jelen van a mintában, akkor az oxigénfejlődés "steady state" értéke az autotróf algában eléri a kezeletlen mintában mérhető érték 20-25%-át (20. ábra, A, ▲—▲). A ftoheterotróf algában a DCQ ugyancsak csökkenti a DCMU gátló hatását, de itt az oxigén szekvencia minimum értéke oxigénfelvételt mutat (20. ábra, B, ▼—▼).



20. ábra. Autotróf (A) és ftoheterotróf (B) módon nevelt *Chlamydomonas stellata* fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődése. (A): kezeletlen (○---○), 1 mM DCQ-val (●—●) valamint 1 mM DCQ-val és 0.5 μM DCMU-val (▲—▲) kezelt autotróf sejtek. (B): kezeletlen (□---□), 1 mM DCQ-val (■—■) valamint 1 mM DCQ-val és 0.5 μM DCMU-val (▼—▼) kezelt ftoheterotróf sejtek.

Az irodalmi adatok szerint a DCQ elektronokat fogad a fotoszintetikus elektrontranszportláncban a DCMU és DBMIB hatóhelye között (Izawa, 1980; Jursinic és Dennenberg, 1988). Kísérleteink azonban arra engednek következtetni, hogy a Q_B nem az egyetlen hatóhelye a DCQ mesterséges elektronakceptornak, hiszen a Q_B helyén bekötődő DCMU gátló hatását a DCQ lecsökkenti. A Q_A -tól a DCQ-felé történő elektrontranszport azonban nem igazán hatékony, hiszen egyébként a DCMU hatástalan lenne. Ugyanakkor ennek a gyenge hatékonyságú elektrontranszportnak az oxigén szekvencia erőteljes csillapodásában kellene megnyilvánulnia. Ilyet azonban nem tapasztaltunk, tehát arra következtettünk, hogy a DCQ megváltoztatja a DCMU affinitását a Q_B kötőhely irányában. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés mérése a PSII akceptor oldalát érintő kemikáliák (pl. herbicidek) bekötődési tulajdonságainak vizsgálatára is jól alkalmazható.

A fényimpulzusokkal gerjesztett oxigénfejlődést vizsgálva nem kapunk adatokat a fotoszintetikusan fejlesztett oxigén abszolút értékéről, ezért a kísérleteket megismételtük Clark típusú elektróddal. A mesterséges elektronakceptorok valamint a DCMU hatása ezzel a módszerrel is a fentebb leírt eredményeket szolgáltatta.

A ftoheterotróf nevelési körülmények között élő *Chl. stellata* alacsony oxigénfelszabadító képessége és a karakterisztikus négyes periódusú oszcilláció hiánya magyarázható az elektrontranszport korlátozásával a PSII redukáló oldalán. Ez utóbbi feltételezést fluoreszcencia indukciós (Wiessner és mtsai, 1981), valamint termolumineszcencia mérések (Wiessner és Demeter, 1988) támasztják alá. A DCQ-val kapott eredmények is beilleszthetők ebbe a képbe. A ftoheterotróf nevelés okozta zavart a PSII akceptor oldalán a mesterséges elektronakceptor kivédi, ha elektronokat tud fogadni az elektrontranszport láncban kialakult gátlási pont előtt és így az oxigénfejlődés helyreáll. Az oxigén szekvencia négyes periódussal oszcillál, a kezdeti és az átmeneti paraméterek értékei hasonlóak az autotróf alga értékeihez. Megállapítható tehát, hogy a ftoheterotróf nevelési körülmények a vízbontás mechanizmusát nem módosítják az aktív centrumokban.

A ftoheterotróf *Chl. stellata* oxigénfejlesztése azonban még DCQ jelenlétében sem éri el az autotróf alga oxigénfejlesztésének szintjét. Ennek oka lehet az acetát közvetlen hatása a fotoszintetikus vízbontásra (Saygin és mtsai, 1986) vagy a CO_2 elvonás hatása a PSII donor oldalára (Mende és Wiessner, 1985). Lehetséges az is, hogy a ftoheterotróf nevelés során csökken a PSII reakciócentrumok száma. Ez utóbbi feltételezés további vizsgálatokat igényel. Az azonban már ismeretes, hogy a fénybegyűjtő antenna klorofill proteinek degradálódnak a ftoheterotróf algában (Brandt és Wiessner, 1984; Winter és Mende, 1988; Wiessner és mtsai, 1990). Ennek az oxigénfejlődés növekedését kellene eredményeznie azonos klorofill koncentrációjú

autotróf és fotoheterotróf minta összehasonlításakor. A fotoheterotróf módon nevelt *Chl. stellata* oxigénfejlődése azonban mindössze kb. negyede az autotróf algáénak, tehát a végeredményt az oxigénfejlesztést csökkentő folyamatok határozzák meg.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy habár a CO₂-mentes atmoszféra és az acetát jelenléte gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot a *Chl. stellata* zöld algában és drasztikusan csökkenti az oxigénfejlődést, a vízbontás mechanizmusa azonban sértetlen marad az aktív centrumokban, hiszen DCQ mesterséges elektronakceptor jelenlétében helyreáll az oxigénfejlődés karakterisztikus négyes periódusú oszcillációja.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fotoszintetikus oxigénfejlődés mechanizmusának elméleti és kísérleti vizsgálata során kapott eredményeink a következőkben foglalhatóak össze:

- Megmutattuk, hogy a Kok modell azon alapfeltevése, mely szerint a vízbontó enzim S_0 oxidációs állapota sötétben stabil, nem helytálló. Az S_0 állapot szobahőmérsékleten történő sötétadaptálás alatt spontán módon kb. 10 perces felezési idővel az S_1 állapotba konvertálódik. A konverzióhoz szükséges pozitív töltés a második fotokémiai rendszer Tir-D donorjának oxidált állapotából ered; a Tir-D redukálódik.

- Közvetlen kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a vízbontó enzim S_2 , S_3 oxidációs állapotainak lecsengésében megjelenő gyors fázis ezen állapotok és a redukált Tir-D közötti töltésátadásból származik. A folyamat félideje szobahőmérsékleten 1-2 s. Ugyanez a töltésátadás okozza az eredeti Kok modellből meghatározható látszólagos S_0 populáció frekvenciafüggését is.

- Azzal, hogy egyértelműen kimutattuk az S_2 , S_3 állapotok gyors fázisa és a redukált Tir-D közötti összefüggést, egyúttal igen olcsó és viszonylag gyors tesztelő módszert is szolgáltatunk a Tir-D redox állapotának meghatározására.

- A redukált Tir-D szerepét felismerve és megvizsgálva az oxigénfejlődés mechanizmusában, beépítettük a donort a Kok modellbe. A módosított modell helyességét a számítógépes görbeillesztések eredménye igazolja.

- Megmutattuk, hogy a Tir-D oxidált formája kb. 13 hét felezési idővel lecseng a tilakoidok -70°C hőmérsékletű, sötétben történő tárolása alatt, és hogy ezen körülmények között a Tir-D-t a citokróm *b*-559 magas potenciálú formája redukálja a centrumok nagy részében.

- Megmértük az S_2 , S_3 állapotok lecsengésének hőmérséklettől való függését. Ebből meghatároztuk az S_2 , S_3 állapotok és a redukált Tir-D közötti töltésátadás, valamint az S_2 , S_3 állapotok lecsengésében a lassú fázist előidéző folyamat aktiválási energiáját.

- A 33 kDa-os perifériális protein vízbontásban betöltött *in vivo* szerepét vizsgáltuk a fehérjét kódoló *psbO* gén-hiányos *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium mutánsokban. Megállapítottuk, hogy bár a 33 kDa-os protein jelenléte nem feltétlenül szükséges a víz oxidációjához, mégis hiányában a centrumok csupán kisebb hányadában működik a vízbontó komplex, és ezekben is hátráltatott a magasabb S állapotok kialakulása.

– A *Chlamydomonas stellata* zöld alga vizsgálatával példát mutattunk a fényimpulzusokkal indukált oxigénfejlődés mérés alkalmazhatóságára. Megállapítottuk, hogy a fotoheterotróf nevelési körülmények (acetát és CO₂ mentes levegő) nem károsítják a vízbontási mechanizmust, bár az elektrontranszportot gátolják és drasztikusan csökkentik az oxigénfejlődést.

A munka alapján megjelent közlemények:

Vass, I., Deák, Zs., Demeter, S. and Hideg, É. (1989) "Charge equilibrium between the water-oxidizing complex and donor D in photosystem II" in Current Research in Photosynthesis (M. Baltscheffsky ed.) Vol. I. pp. 809-812

Jegerschöld, C., Vass, I., Deák, Zs. and Styring, S. (1990) "Slow reduction of an accessory electron donor of photosystem II, tyrosine-D, during low temperature storage of thylakoids in the dark" in Abstracts of the 6th European Bioenergetics Conference, Noordwijkerhout, The Netherlands

Vass, I., Deák, Zs. and Hideg É. (1990) "Charge equilibrium between the water-oxidizing complex and the electron donor tyrosine-D in Photosystem II" Biochim. Biophys. Acta 1017, 63-69

Vass, I., Deák, Zs., Jegerschöld, C. and Styring, S. (1990) "The accessory electron donor tyrosine-D of Photosystem II is slowly reduced in the dark during low-temperature storage of isolated thylakoids" Biochim. Biophys. Acta 1018, 41-46

Wiessner, W., Deák, Zs., Mennde, D. and Demeter, S. (1991) "Flash oxygen yield patterns of autotrophically and photoheterotrophically grown *Chlamydomonas stellata* in the presence and absence of lipophilic acceptors" Photosynth. Res. 29, 37-44

Vass, I., Cook, K.M., Deák, Zs. and Mayes, S.R. (1992) "Thermoluminescence and flash-oxygen characterization of the IC2 deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking the Photosystem II 33 kDa protein" Biochim. Biophys. Acta 1102, 195-201

A munkához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Teklemariam, T.A., Demeter, S., Deák, Zs., Surányi, Gy. and Borbély, Gy. (1990) "AS-1 cyanophage infection inhibits the photosynthetic electron flow of photosystem II in *Synechococcus* sp. PCC 6301, a cyanobacterium" FEBS Lett. 270, 211-215

Wiessner, W., Mende, D., Deák, Zs. and Demeter, S. (1991) "Thermoluminescence and Delayed Luminescence Investigation of the Green Alga, *Chlamydomonas stellata*" Bot. Acta 104, 295-299

Deák, Zs., Vass, I. and Styring, S. (1992) "Redox interaction of Tyrosine-D with the S states of the water-oxidizing complex in intact and chloride-depleted photosystem II" (benyújtva, Biochim. Biophys. Acta)

7. IDÉZETT IRODALOM

- Abramowicz, D.A. and Dismukes, G.G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 309-318
- Andersson, B. and Akerlund, H.-E. (1987) in *Topics in Photosynthesis* (J. Barber, ed) Vol. 8, pp. 379-420, Elsevier, Amsterdam
- Andersson, B. and Styring, S. (1991) *Current Topics in Bioenergetics* 16, 1-81
- Arnon, D.I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-5
- Babcock, G.T. and Sauer, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325, 483-503
- Bader, K.P., Thibault, P. and Schmid, G.H. (1983) *Z. Naturforsch.* 38c, 778-792
- Bendall, D.S. and Rolph, S.A. (1987) *Methods Enzymol.* 148, 259-273
- Bouges-Bocquet, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 772-785
- Brandt, P. and Wiessner, W. (1984) *Plant Physiol.* 71, 128-131
- Burnap, R.L. and Sherman, L.A. (1991) *Biochemistry* 30, 440-446
- Cao, J., Vermaas, W.F.J. and Govindjee (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1059, 171-180
- Cramer, W.A. and Whitmarsh, J. (1977) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 133-172
- Cramer, W.A., Furbacher, P.N., Szczepaniak, A. and Tae, G.-S. (1990) in *Current Research in Photosynthesis* (M. Baltscheffsky, ed) Vol. 3, pp. 221-230, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Crofts, A.R. and Wraight, C.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 149-185
- De Paula, J.C., Innes, J.B. and Brudvig, G.W. (1985) *Biochemistry* 24, 8114-8120
- Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. and McIntosh, L. (1988a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 427-430
- Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T. and McIntosh, L. (1988b) *Biochemistry* 27, 9071-9074
- Delrieu, M.-J. (1974) *Photochem. Photobiol.* 20, 441-454
- Demeter, S. and Vass, I. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 764, 24-32
- Demeter, S. and Govindjee (1989) *Physiol. Plant.* 75, 121-130
- Duysens, L.N.M. and Sweers, H.E. (1963) in *Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, pp. 353-372, Tokyo University Press, Tokyo
- Eckert, H.-J., Toyoshima, Y., Akabori, K. and Dismukes, G.C. (1987) *Photosynth. Res.* 14, 31-41
- Erikson, J.M., Rochaix, J.-D. and Delepelaire, P. (1985) in *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus* (K.E. Steinback, S. Bonitz, C.J. Arntzen and L. Bogorad, eds) pp. 53-65, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Forbush, B., Kok, B. and McGloin, M. (1971) *Photochem. Photobiol.* 14, 307-321
- Förster, V., Hong, Y.-Q. and Junge, W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 638, 141-152
- Fowler, C.F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 414-421

- Franzen, L.-G., Styring, S., Etienne, A.-L., Hansson, Ö. and Vernotte, C. (1986) *Photobiochem. Photobiophys.* 13, 15-28
- Hansson, Ö. and Wydrzynski, T. (1990) *Photosynth. Res.* 23, 131-162
- Hanssum, B., Dohnt, G. and Renger, G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 806, 210-220
- Hideg, É. (1987) *Kandidátusi értekezés*
- Hideg, É. and Demeter, S. (1986) *FEBS Lett.* 200, 139-143
- Hill, F.R.S. and Bendall, F. (1960) *Nature (London)* 186, 136-137
- Inui, T., Kawamori, A., Kuroda, G., Ono, T. and Inoue, Y. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 973, 147-152
- Joliot, A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 357, 439-448
- Joliot, P. (1972) *Methods Enzymol.* 24, 123-134
- Joliot, P. and Joliot, A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 625-634
- Joliot, P. and Kok, B. (1975) in *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee ed.), pp. 387-412, Academic Press, New York
- Joliot, P., Barbieri, G. and Chabaud, R. (1969) *Photochem. Photobiol.* 10, 309-329
- Jursinic, P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 635, 38-52
- Kawamori, A., Satoh, J., Inui, T. and Satoh, K. (1987) *FEBS Lett.* 217, 134-138
- Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475
- Kuhl, A. (1962) in *Vorträge Gesamtgebiet Botanik NF 1*, pp 157-166, Gustav Fischer, Stuttgart
- Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Chollar, S., Melis, A. and Malkin, R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 724, 201-211
- Lavorel, J. (1976) *J. Theor. Biol.* 57, 171-185
- Lavorel, J., and Maison-Peteri, B. (1983) *Physiol. Veg.* 21, 509-517
- MacKinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315-322
- Maróti, P., Laczkó, G. and Szalay, L. (1984) *Acta Phys. Hung.* 55, 175-184
- Mattoo, A.K., Pick, U., Hoffman-Falk, H. and Edelman, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1542-1576
- Mayes, S.R., Cook, K.M., Self, S.J., Zhang, Z. and Barber, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 1-12
- Mayfield, S.P., Bennoun, P. and Rochaix, J.-D. (1987) *EMBO J.* 6, 313-318
- Mei, R., Green, J.P., Sayre, R.T. and Frasch, W.D. (1989) *Biochemistry* 28, 5560-5567
- Mende, D. and Wiessner, W. (1983) *Photobiochem. Photobiophys.* 6, 1-7
- Mende, D. and Wiessner, W. (1985) *J. Plant Physiol.* 118, 259-266
- Metz, J.G., Nixon, P.J., Rögner, M., Brudvig, G.W. and Diner, B.A. (1989) *Biochemistry* 28, 6960-6969

- Michel, H. and Deisenhofer, J. (1986) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (L.A. Stachelin and C.J. Arntzen, eds) New Ser. Vol. 19, pp. 371-381, Springer-Verlag, Berlin
- Miyao, M. and Murata, N. (1984) *FEBS Lett.* 170, 350-354
- Miyao, M. and Murata, N. (1985) *FEBS Lett.* 180, 303-308
- Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maison-Peteri, B., Boussac, A. and Etienne, A.-L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 890, 151-159
- Moenne-Loccoz, P., Robert, B. and Lutz, M. (1989) *Biochemistry* 28, 3641-3645
- Murata, N. and Miyao, M. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10, 122-124
- Murata, N., Miyao, M. and Kuwabara, T. (1983) in *The Oxygen Evolving Systems of Photosynthesis* (Y. Inoue, A.R. Crofts, Govindjee, N. Murata, G. Renger and K. Satoh, eds.) pp. 213-222, Academic Press, Tokyo
- Nanba, O. and Satoh, K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 109-112
- Ono, T. and Inoue, Y. (1984) *FEBS Lett.* 168, 281-286
- Ono, T. and Inoue, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 806, 331-340
- Ono, T. and Inoue, Y. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 850, 380-389
- Pakrasi, H.B., Williams, J.G.K. and Arntzen, C.J. (1988) *EMBO J.* 7, 325-332
- Philbrick, J.B. and Zilinskas, B.A. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 418-425
- Philbrick, J.B., Diner, B.A. and Zilinskas, B.A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13370-13377
- Priestly, J. (1776) in *Experiments and Observations on Different Kinds of Air*, Vol. I., J. Johnson, London
- Radmer, R. and Ollinger, O. (1980) *FEBS Lett.* 110, 57-61
- Rappaport, F. and Lavergne, J. (1991) *Biochemistry* 30, 10004-10012
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stainer, R.Y. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61
- Rochaix, J.-D., Dron, M., Rahire, M. and Malnoe, P. (1984) *Plant Mol. Biol.* 3, 363-370
- Ruben, S., Randall, M., Kamen, M. and Hyde, J.L. (1941) *J. Am. Chem. Soc.* 63, 877-879
- Rutherford, A.W., Renger, G., Koike, H. and Inoue, Y. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 548-556
- Sane, P.V. and Rutherford, A.W. (1986) in *Light Emission by Plants and Bacteria* (Govindjee, J. Ames and D.C. Fork, eds.) pp. 329-361, Academic Press, New York
- Saphon, S. and Crofts, A.R. (1977) *Z. Naturforsch.* 32C, 617-626
- Saygin, O., Gerken, S., Meyer, B. and Witt, H.T. (1986) *Photosynth. Res.* 9, 71-78

- Schatz, G.H., Brock, H. and Holzwarth, A.R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8414-8418
- Sinclair, J. and Arnason, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 368, 393-400
- Stemler, A. and Radmer, R. (1975) *Science* 190, 457-458
- Styring, S. and Rutherford, A.W. (1987) *Biochemistry* 26, 2401-2405
- Styring, S. and Rutherford, A.W. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 933, 378-387
- Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E. and Styring, S. (1990) *EMBO J.* 7, 2051-2059
- Szalay L. és Lehoczki E. (1979) *A biológia aktuális problémái* (szerk. Csaba Gy.) 17, 9-89
- Trebst, A. (1986) *Z. Naturforsch.* 41c, 240-245
- Vass, I. and Inoue, Y. (1991) in *Topics in Photosynthesis* (J. Barber, ed.) Vol. 11, pp. 259-294, Elsevier, Amsterdam
- Vass, I., Horváth, G., Herczeg, T. and Demeter, S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 634, 140-152
- Vass, I., Ono, T. and Inoue, Y. (1987a) *FEBS Lett.* 211, 215-220
- Vass, I., Ono, T. and Inoue, Y. (1987b) *Biochim. Biophys. Acta* 892, 224-235
- Vass, I., Ono, T., Homann, P.H. and Inoue, Y. (1987c) in *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins, J., ed.) Vol. I, pp. 649-652. Martinus Nijhoff, Dordrecht
- Vass, I., Deák, Zs. and Hideg, É. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1017, 63-69
- Velthuys, B.R. (1982) *FEBS Lett.* 126, 277-281
- Velthuys, B.R. and Visser, J.W.M. (1975) *FEBS Lett.* 55, 109-112
- Vermaas, W.F.J., Renger, G. and Dohnt, G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 764, 194-202
- Vermaas, W.F.J., Rutherford, A.W. and Hansson, O. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8477-8481
- Vermeglio, A. and Mathis, P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 314, 57-65
- Warburg, O. and Krippahl, G. (1960) *Z. Naturforsch.* 15b, 367-369
- Wasielewski, M.R., Johnson, D.G., Seibert, M. and Govindjee (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 524-528
- Wiessner, W. (1968) *Planta (Berl)* 79, 92-98
- Wiessner, W. and Fork, D.C. (1970) *Carnegie Inst. Year Book* 69, 695-699
- Wiessner, W. and French, C.S. (1970) *Planta (Berl)* 94, 78-90
- Wiessner, W. and Demeter, S. (1988) *Photosynth. Res.* 18, 345-356
- Wiessner, W., Dubertret, G., Henry-Hiss, Y., Mende, D. and Lefort-Tran, M. (1981) *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 94, 503-515
- Wiessner, W., Kohnke, B., Kloppstech, K., Mende, D., Radunz, A. and Winter, J. (1990) *Bot. Acta* 103, 162-167
- Williams, J.G.K. (1988) *Methods. Enzymol.* 167, 766-778

Winter, J. and Mende, D. (1988) *Plant Science* 58, 145-150

Wydrzynski, T.J. (1982) in *Photosynthesis Vol. I. Energy Conversion by Plants and Bacteria* (Govindjee ed.), pp. 469-506, Academic Press, New York

Wydrzynski, T.J. and Sauer, K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 589, 56-70

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatomban az 1989 és 1992 között, nagyrészt az MTA Szegedi Biológiai Központ Növényélettani Intézetének Fotoszintézis Csoportjában végzett vizsgálataim eredményét foglaltam össze.

Ezúton fejezem ki köszönetemet Dr. Solymosy Ferencnek és Dr. Dudits Dénesnek az intézet volt, ill. jelenlegi igazgatójának, valamint volt csoportvezetőmnek, Dr. Demeter Sándornak, hogy munkámat lehetővé tették.

Külön köszönöm témavezetőmnek, Dr. Vass Imrének a feladataim kiválasztásában megnyilvánuló bizalmát, a figyelmet, amellyel munkámat kísérte, a türelmet, amellyel tanított.

Köszönöm Dr. Hideg Évának, hogy éredklődésemet a fotoszintetikus oxigénfejlődés témakörére irányította, és a tanácsokat, melyekkel dolgozatom elkészítésében segített.

Köszönettel tartozom Dr. Stenbjörn Styringnek, Caroline Jegerschöldnek (University of Stockholm, Sweden), Dr. Wolfgang Wiessnernek, Dr. Dirk Mendenek (University of Göttingen, Germany), Prof. James Barbernek, Steve Mayesnek és Katie Cooknak (Imperial College, london, U.K.), akik a külföldi együttműködéssel készült munkában vezetőim ill. munkatársaim voltak.

Megköszönöm Sándor Györgyi asszisztensnek a laboratóriumi munkában, valamint Kiss Gábor elektromérnöknek a kísérleti berendezések megépítésében nyújtott segítségét.

Végül pedig szeretném megköszönni családom megértését és türelmét, mellyel munkámat mindvégig támogatta.