

## Tartalomjegyzék

A két fotokémiai rendszer arányának és a fényenergia  
megoszlásának redox szabályozása metabolikus  
adaptáció során zöldségben

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fotoszintézis szerepe a növény anyagcserében 4

Az ATP és NADPH termelése és a két metabolit mennyiségi arányának  
szabályozása 7

A két fotokémiai rendszer működésének összehangolása 15

Az elnyelt fényenergia elosztásának szabályozása a két fotokémiai  
rendszer között 16

A két fotokémiai rendszer mennyiségi arányának szabályozása 21

*Chlamydomonas reinhardtii* 28

## MUNKITÖRZÉS

Témavezető: Dr. Demeter Sándor  
a MTA doktora

*Chlamydomonas reinhardtii* nevelési körülményei 32

Biológiai módszerek 32

Tilakoid izolálás 32

Klorofil koncentráció meghatározása 33

Az ATP mennyiségének meghatározása 33

A NADPH mennyiségének meghatározása 33

A tilakoid membrán fehérjék kiválasztása SDS-poliakrilamid 34

gélelektroforézissal

Szeged

2002

Az LHC II foszforilációjának vizsgálata 35

# Tartalomjegyzék

	oldal
BEVEZETÉS	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
A fotoszintézis szerepe a növényi anyagcserében	4
Az ATP és NADPH termelése és a két metabolit mennyiségi arányának szabályozása	7
A két fotokémiai rendszer működésének összehangolása	15
Az elnyelt fényenergia eloszlásának szabályozása a két fotokémiai rendszer között	16
A két fotokémiai rendszer mennyiségi arányának szabályozása	21
<i>Chlamydothrys stellata</i>	28
CÉLKITŰZÉS	31
KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
<i>Chlamydothrys stellata</i> nevelési körülményei	32
Biokémiai módszerek	32
Tilakoid izolálás	32
Klorofill koncentráció meghatározás	33
Az ATP mennyiségének meghatározása	33
A NADPH mennyiségének meghatározása	33
A tilakoid membrán fehérjék elválasztása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel	34
Az LHC II foszforilációjának vizsgálata	35

Fehérjék immunoblott analízise	35
A <i>psbA</i> és <i>psaA</i> mRNS-ek mennyiségének meghatározása	36
Biofizikai módszerek	37
Az oxigénfejlődés mérése	37
A fluoreszcencia indukció mérése	37
77 K-es fluoreszcencia emissziós spektrum mérése	38
A termolumineszcencia mérése	38
Fényindukált citokróm <i>f</i> abszorpció változás mérés	39
Fényindukált P700 abszorpció változás mérés	39
A PS I, PS II és a citokróm <i>b<sub>6</sub>/f</i> complex spektrofotometriás meghatározása	40
A tirozin D <sup>+</sup> ESR spektroszkópiás meghatározása	41
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	43
Az acetát metabolizmus hatása a fotoszintetikus elektrontranszportra	43
Az acetát metabolizmus hatása a PS I/PS II sztöichiometriára	65
Az acetát metabolizmus hatása a <i>psbA</i> és <i>psaA</i> gének expressziójára	74
A state 1/state 2 átmenet és a megnövekedett PS I/PS II arány növeli a ciklikus fotofoszforiláció kapacitását	82
ÖSSZEFOGLALÁS	87
SUMMARY	90
IDÉZETT IRODALOM	98



## Rövidítések jegyzéke

A <sub>o</sub>	a PS I elsődleges elektron akceptora
A <sub>1</sub>	a PS II másodlagos elektron akceptora
ADP	adenozin-difoszfát
APS	adenozin-5'-foszfatoszulfát
ATP	adenozin-trifoszfát
cPABP	kloroplasztisz poliadenilát-kötő fehérje
cPDI	kloroplasztisz protein diszulfid izomeráz
CRF	<i>cab</i> gén repressziós faktor
cyt	citokróm
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-izopropil-p-benzokinon
DCMU	3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6 diklórfenol-indofenol
ESR	elektron spin rezonancia
F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub> , F <sub>X</sub>	a PS I Fe-S centrumot tartalmazó elektron akceptorai
Fd	ferredoxin
F <sub>o</sub> , F <sub>i</sub> , F <sub>m</sub>	a fluoreszcencia indukció kezdeti, közbülső és maximális értéke
F <sub>v</sub>	változó fluoreszcencia (F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )
FNR	ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz
FQR	ferredoxin-plasztokinon-oxidoreduktáz
LHC II	a PS II fő fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
MFA	monofluoro-ecetsav
MV	metilvörös
NADH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NDH	NADH-plasztokinon-oxidoreduktáz
NEM	N-etil-maleinimid
P <sub>680</sub>	a második fotokémiai rendszer reakciócentruma
P700	az első fotokémiai rendszer reakciócentruma
PAPS	3'-foszfoadenozin-5'-foszfatoszulfát



PP <sub>i</sub>	anorganikus ortofoszfát
P <sub>p</sub> BQ	fenil-p-benzokinon
PQ	plasztokinon
PS I	első fotokémiai rendszer
PS II	második fotokémiai rendszer
PsaA	A PS I reakciócentrum fehérjéje
<i>PsaA</i>	A PS I reakciócentrum fehérjét kódoló gén
PsbA	A PS II reakciócentrum fehérjéje (D1 protein)
<i>psbA</i>	A PS II reakciócentrum fehérjét (D1 protein) kódoló gén
Q <sub>o</sub>	a citokróm <i>b<sub>6</sub>/f</i> komplex lumen oldali PQH <sub>2</sub> kötőhelye
Q <sub>A</sub>	a PS II elsődleges kinon akceptora
Q <sub>B</sub>	a PS II másodlagos kinon akceptora
TL	termolumineszcencia
tyrZ	a PsbA fehérje tyr <sub>161</sub> aminosav oldallánca
tyrD	a PsbD fehérje tyr <sub>160</sub> oldallánca

## Bevezetés

A fotoszintézis központi szerepet játszik mind a növényi, mind a prokarióta fotoszintetizáló szervezetek anyagcseréjében. A fotoszintézis során a növények  $\text{CO}_2$ -ból és vízből szénhidrátokat állítanak elő, amihez az energiát a fény biztosítja. Az így előállított szénhidrátok biztosítják a szénvázat és az energiát a többi szerves molekula szintéziséhez.

A fotoszintézis azonban nem csak a növény számára jelentős, hanem az egész élővilág számára meghatározó jelentőségű. A heterotróf élőlények közvetve vagy közvetlenül a tápláléklánc alján álló autotróf szervezetekből nyerik az energiát ill. a testük felépítéséhez szükséges szerves molekulákat. A fotoszintézisnek köszönhető a geológiai idők során a föld légkörében felhalmozott oxigén is, amely végső elektron akceptorként szolgál az oxidatív foszforiláció számára. A természetes körforgásból időlegesen kivont fosszilis szén és kőolajkészletek jelentik az ember legfőbb energiaforrását. Ily módon, leszámítva néhány szélsőséges és elszigetelt körülmények között élő kemolitotróf élőlényt, a fotoszintézis jelenti azt a kaput, amely meghatározza az egész bioszféra energia- és anyagáramlását. A fotoszintetizáló szervezetek évente kb.  $2 \times 10^{11}$  tonna szervesanyagot hoznak létre, amelynek a felét tengeri prokarióta (zöld- és bimbobaktériumok, kéalgák) és eukarióta mikroorganizmusok (zöldalgák, diatómák és dinoflagelláták) termelik.

Mivel a primer biomassa képződésében a fotoszintézis jelenti a szűk keresztmetszetet, a fotoszintetikus energiaátalakítás hatásfoka rendkívüli jelentőséggel bír. A föld felszínére eső sugárzásból a fotoszintetikus szervezetek kb. 0,2 %-ot hasznosítanak. Egyetlen  $\text{O}_2$  molekula képződéséhez vagy  $\text{CO}_2$  molekula asszimilációjához minimálisan 8 foton abszorpciója szükséges. *In vivo* körülmények



között a növényeknek ehhez 10-12 foton elnyelésére van szükségük. A reakciócentrumok szintjén az energiaátalakítás kb. 85-90 %-os. Az energiaátalakításnak ez a viszonylag nagy hatásfoka különösen akkor figyelemreméltó, ha tekintetbe vesszük, hogy azt a növények milyen változatos életkörülmények között is képesek fenntartani. A fotoszintézis szempontjából legfontosabb környezeti tényező, a fény, a föld felszínén élőhelytípusonként nagyon változó. Az erdők napnak kitett lombkorona szintjében mérhető közvetlen, erős sugárzásból a gyepszintig alacsony intenzitású, zöld és távoli vörös hullámhosszakban feldúsult szórt fény jut. A tengerekben és tavakban a mélységgel a fény spektrális összetétele ellenkezően változik. A felszínre beeső fehér fény 50-80 m mélységben kékeszöldé válik. 150 m mélyre már csak a zöld sugarak jutnak el. A környezeti tényezők egy adott élőhelyen az idő függvényében is változnak. Az időjárás következtében a hőmérsékleti és fényviszonyok néhány óra alatt megváltozhatnak. A klimatikus viszonyoknak természetes napi és éves ritmusa van. A növények anyagcserefolyamatait meghatározó tápanyag ellátottság a talaj kilugozódása, a vizek eutrófizálódása, vagy a levegő CO<sub>2</sub> koncentrációjának változása miatt rövid időintervallumban is megváltozhatnak. A külső körülmények mellett, a fotoszintetizáló szervezetek fiziológiai állapota (osztódás, csírázás, virág- és termésképzés) az endogén tényezők megváltozásain keresztül szintén hatással van a fotoszintetikus folyamatokra.

Az állandóan változó külső és belső körülmények miatt, egy adott feltételekre optimalizált, statikus fotoszintetikus apparátus nem lenne képes a fotoszintézis hatásfokát folyamatosan magas értéken tartani. A folyamatos és hatékony fotoszintézishez a fotoszintetikus membránok dinamikus működésére van szükség. A fotoszintetikus folyamatok megértéséhez szükséges feltárni azokat a molekuláris



szabályozó mechanizmusokat, melyek kellő rugalmasságot képesek biztosítani a fotoszintetikus apparátus számára ahhoz, hogy a növényi anyagcsere és a bioszféra működési alapját képező fotoszintézis kellő hatásfokkal működjön.

## Irodalmi áttekintés

### A fotoszintézis szerepe a növényi anyagcserében

A fotoszintézis során a növények a fényenergiát kémiai energiává alakítják át és azt azután szerves anyagaik szintézisére használják fel. A fotoszintézis fényszakaszában a vízbontásból származó oxigén felszabadulása mellett ATP és redukált NADP keletkezik, melyek elsősorban a CO<sub>2</sub> trióz-foszfátokká történő redukációjában használnak fel a Calvin-ciklus során. A fotoszintetikus CO<sub>2</sub> redukció a következő alapegyenletben foglalható össze:



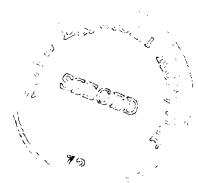
A fotoszintézis központi jelentőségű folyamat a növényi anyagcserében. A fotoszintézisben keletkező szénhidrátok szolgáltatják a szénvázat a sejt alkotó elemeit képező szerves molekulák számára, ill. biztosítják az energiát az összes többi életfolyamathoz. A fotoszintézis nem csak közvetve a szénhidrát szintézisen keresztül kapcsolódik a sejt anyag és energiaforgalmába. A fotoszintézis fényszakaszában keletkező ATP és NADPH közvetlenül is részt vehet egyéb szintetikus folyamatok energia és elektron igényeinek kielégítésében. Számos, a kloroplasztison belül lejátszódó biokémiai folyamat közvetlenül kapcsolódik a fotoszintetikus elektrontranszportoz. Specifikus transzport rendszerek segítségével az ATP ill. NADPH a kloroplasztisz külső membránján is keresztüljuthatnak a citoszolba, így lehetőség nyílik arra, hogy a fotoszintézis fedezze a plasztiszon kívül végbemenő folyamatok energia és redukáló erő igényeit is. A fotoszintézishez közvetlenül

kapcsolódó folyamatok közül legjobban a nitrogén fotoasszimilációja tanulmányozott. Az alga sejtekben található szerves vegyületek kb. 50 %-a tartalmaz nitrogént (Vanlerberghe és mtsai., 1990). A kötött nitrogén nagy része a  $\text{NO}_3^-$   $\text{NO}_2^-$ -té, majd  $\text{NH}_4^+$ -vá történő redukációjából ered. A  $\text{NO}_3^-$  redukciója  $\text{NO}_2^-$ -té a citoplazmában történik egy dehidrogenáz enzim hatására. A redukcióhoz szükséges redukáló erő a kloroplasztiszból származik. A citoplazmában képződött nitrit a kloroplasztiszba jut, ahol ammóniává redukálódik. Az elektrondonor a fotoszintetikusan redukált ferredoxin. Az ammónia asszimilációja szintén végbemehet a kloroplasztiszban. A fotoasszimiláció során az ammónia két lépésben L-glutamátba épül be. Az ehhez szükséges ATP-t és redukált ferredoxint a fotoszintetikus elektrontranszport szolgáltatja.

A nitrát redukcióhoz hasonlóan az algák és magasabb rendű növények képesek a szulfát fotoasszimilációjára is. Az asszimilatív szulfát redukció csaknem kizárólag a megvilágított levelek kloroplasztiszaiban megy végbe. A folyamat során a szulfát több lépésben ATP és 8 elektron felhasználásával APS, PAPS és fehérjéhez kötött szulfit köztes termékeken keresztül szulfiddá redukálódik. Az így képződött redukált kén azután vagy a levélben, vagy más növényi szervekbe történő elszállítás után épül be aminosavakba, fehérjékbe, lipidekbe vagy kofaktorokba.

A kloroplasztisz zsírsavak szintézisében is résztvesz. A zsírsavlánc felépítéséhez szükséges aktív acetát is a fotofoszforiláció során képződött ATP felhasználásával jön létre.

A kén, nitrogén és lipid anyagcsere mellett a fotoszintézis közvetlenül részt vesz különböző kinonok, flavonok, növényi hormonok és alkaloidok szintézisében is. Az intermedier anyagcserén kívül a fotofoszforiláció biztosíthatja a nagyon energiaigényes ion- és protonpumpák működéséhez is a kellő mennyiségű ATP-t.





A fenti példák mutatják, hogy a fotoszintetikus fényreakciók milyen sokoldaluan kapcsolódnak a növényi sejt anyagcseréjéhez. Az egyes biokémiai reakcióutak azonban eltérő arányban igénylik az ATP-t és NADPH-t, és ez az arány meglehetősen széles tartományban változhat. A legfontosabb reakciók ATP és elektron igényét az 1. táblázat foglalja össze. Az egyes reakciók egyidőben, az elektron és ATP forrásokért egymással versengve párhuzamosan mehetnek végbe, így együttesen alakítják ki a sejt ATP és NADPH (e<sup>-</sup>) igényét. Az egyes folyamatok egymáshoz viszonyított aktivitása fajoként változhat, és ugyanabban az élőlényben is dinamikusan változhat a fiziológiai állapotnak ill. a környezeti változásoknak megfelelően. Bár növényekben a fotoszintetikusán előállított energia és redukáló erő legfőbb felhasználója a Calvin-ciklus, a többi folyamat is jelentős befolyással lehet az ATP/NADPH követelményre. *Chlamydomonas* algában, fénylimitált körülmények között, a fotoszintetikusán előállított redukáló erőknél akár 40 %-a is a nitrit redukciójára fordítható (Curtis és Megard, 1987), míg telítési fényen ez az érték 20 %-ra csökken. A nitrát redukció,

1. táblázat. A kloroplasztiszból lezajló és a fotoszintetikus elektrontranszporthoz kötődő, legfontosabb anyagcsere-folyamatok ATP és redukáló erő (elektronpár) igénye.

Folyamat	Reakció	ATP/2e <sup>-</sup>
CO <sub>2</sub> fixáció	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O + 3 ATP + 2 NADPH → (CH <sub>2</sub> O)+O <sub>2</sub>	1,5
Nitrát redukció	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 ferredoxin → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	csak e <sup>-</sup>
Nitrit redukció	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 6 ferredoxin → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	csak e <sup>-</sup>
Ammónia asszimiláció	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + glu + 2 OG + ATP + 2 ferredoxin → 2 glu	1
Fehérje szintézis aminosavakból	Aminosav + 4 ATP → fehérje	csak ATP
Nitrát asszimiláció fehérjéig	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + ketosav + 5 ATP + 5 NADPH → fehérje	1
Nitrit asszimiláció fehérjéig	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + ketosav + 5 ATP + 4 NADPH → fehérje	1,25
Ammónia asszimiláció fehérjéig	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + ketosav + 5 ATP + NADPH → fehérje	5
Szulfát redukció	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2 ATP + NADPH → SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	2
Szulfit redukció	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> + 3 NADPH → S <sup>2-</sup>	csak e <sup>-</sup>
Szulfát asszimiláció aminosavig	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2 ATP + 4 NADPH → cisztein	0,5
Zsírsav szintézis	8 AcetylCoA + 7 ATP + 14 NADPH → palmitinsav	0,5

amely a megvilágított kloroplasztiszban a CO<sub>2</sub> redukció intenzitásának csak 6 %-át teszi ki, az ATP/NADPH igényt 1.5-ről 1.33-ra csökkenti (Edwards és Walker, 1983).

A növények természetes környezeti feltételei, a hőmérséklet, tápanyagellátottság, a fényviszonyok ill. a sejtek fiziológiai állapota folyamatosan változik, ami a metabolikus folyamatok sebességére ill. arányára gyakorolt hatásán keresztül befolyásolja a sejtek eredő ATP és redukáló erő felhasználását. Ahhoz, hogy a növény képes legyen előállítani az anyagcserefolyamatok által állandóan változó sztöichiometriai arányban megkövetelt ATP és redukáló erő (NADPH, ferredoxin) mennyiséget, a fotoszintetikus apparátus olyan rugalmas működésére van szükség, mely a két komponens a mindenkori követelményeknek megfelelő arányban képes biztosítani.

### **Az ATP és NADPH termelése és a két metabolit mennyiségi arányának szabályozása**

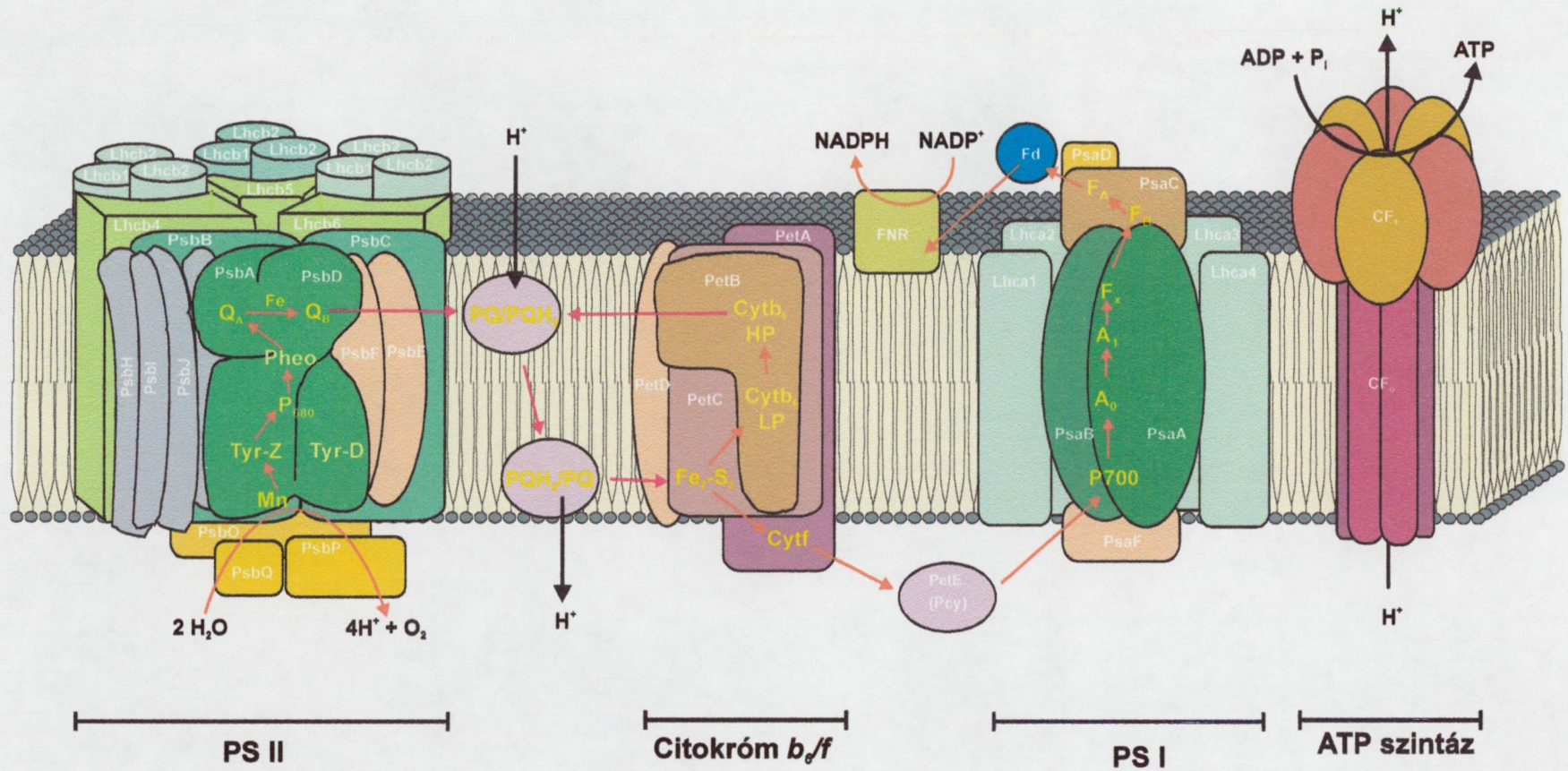
A fényenergia átalakításában négy, a kloroplasztisz tilakoid membránjában elhelyezkedő fehérjekomplex, az első fotokémiai rendszer (PS I), a második fotokémiai rendszer (PS II), a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex és az ATP szintáz, valamint a fehérjekomplexek közötti összeköttetést biztosító mobilis komponensek, a plasztokinon, plasztocianin és a ferredoxin vesznek részt (1. ábra). A két fotokémiai rendszer köti meg a fényenergiát és alakítja redoxpotenciállá, majd a redox energiát a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex alakítja proton elektrokémiai potenciállá, mely az ATP szintáz közreműködésével alakul foszforilációs potenciállá.

A második fotokémiai rendszer felelős a víz oxidációjáért. A vízbontásból származó elektronok a PS II redoxkomponensein keresztül jutnak a PQ molekulákra.

A PS II kb. 20 polipeptid láncból áll. Reakciócentrumát a PsbA (D1 protein) és PsbD (D2 protein) fehérjék heterodimerje és az ahhoz kapcsolódó 2 citokróm  $b_{559}$  fehérje alegység adja. A heterodimer tartalmazza a PS II által katalizált elektrontranszport összes redoxkomponensét: a P680 primer donort, az elsődleges akceptort, a feofitint, továbbá az elsődleges és másodlagos kinon akceptort, a  $Q_A$ -t és  $Q_B$ -t. A két elektron és két  $H^+$  felvételével redukálódott  $Q_B$  leválik a PS II-ről és a PQ poolba kerül. A megvilágítás hatására oxidálódott P680 a vízbontásból származó elektronokkal redukálódik. A vízbontó komplexből az elektronok a PsbA fehérje  $tyr_{161}$  aminosav oldalláncának közvetítésével jutnak a  $P680^+$ -hoz. A primer fotokémiai folyamatokhoz szükséges fényenergiát a PS II reakciócentrumához közvetlenül kapcsolódó belső antenna rendszer ill. a reakciócentrumhoz képest távolabb elhelyezkedő külső antenna rendszer biztosítja. A belső antennarendszert két klorofill  $a$  tartalmú fehérje a PsbB (CP43) és PsbC (CP47) alkotja. Mindkét fehérjekomplex kb. 25 klorofill  $a$  és 5  $\beta$ -karotin molekulát tartalmaz. A külső fénybegyűjtő antenna komplex fő tömegét az LHC II adja amely klorofill  $a$  és klorofill  $b$  molekulákat ill. xantofill pigmenteket tartalmaz. A klorofill  $a/b$  arány 1.2. Az LHC II mellett a külső antenna komplex három járulékos klorofill kötő fehérjét is tartalmaz (Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5). Ezekben a klorofill  $a$  és  $b$  2:1 arányban fordul elő.

A PS II által redukált plasztokinont a citokróm  $b_6/f$  komplex oxidálja vissza. A 4 alegységből álló komplex két magas és két alacsony redoxpotenciálú prosztetikus csoportot tartalmaz, valamint egy lumen oldali és egy sztróma oldali plasztokinon kötőhellyel rendelkezik. A lumen oldali kötőhelyre kötődik a két elektronnal és két proton felvételével redukálódott PQ. A  $PQH_2$  oxidációjából származó elektronok egy része a magas redoxpotenciálú úton, a Rieske vas-kén centrumon és a citokróm  $f$ -en keresztül jut a plasztocianinra. Az elektronok másik része az ún. Q ciklus során





1. ábra. A fotoszintetikus elektrontranszport és az abban résztvevő fehérje és mobilis elektrontranszport komponensek

az alacsony redoxpotenciálu citokrom *b* komponensekre kerül, amely a sztróma oldali kötőhelyre kötődött plasztokinont szemikinonná, majd a második ciklusban kinollá redukálja. A redukált plasztocianin az első fotokémiai rendszer donor oldalához juttatja az elektronokat.

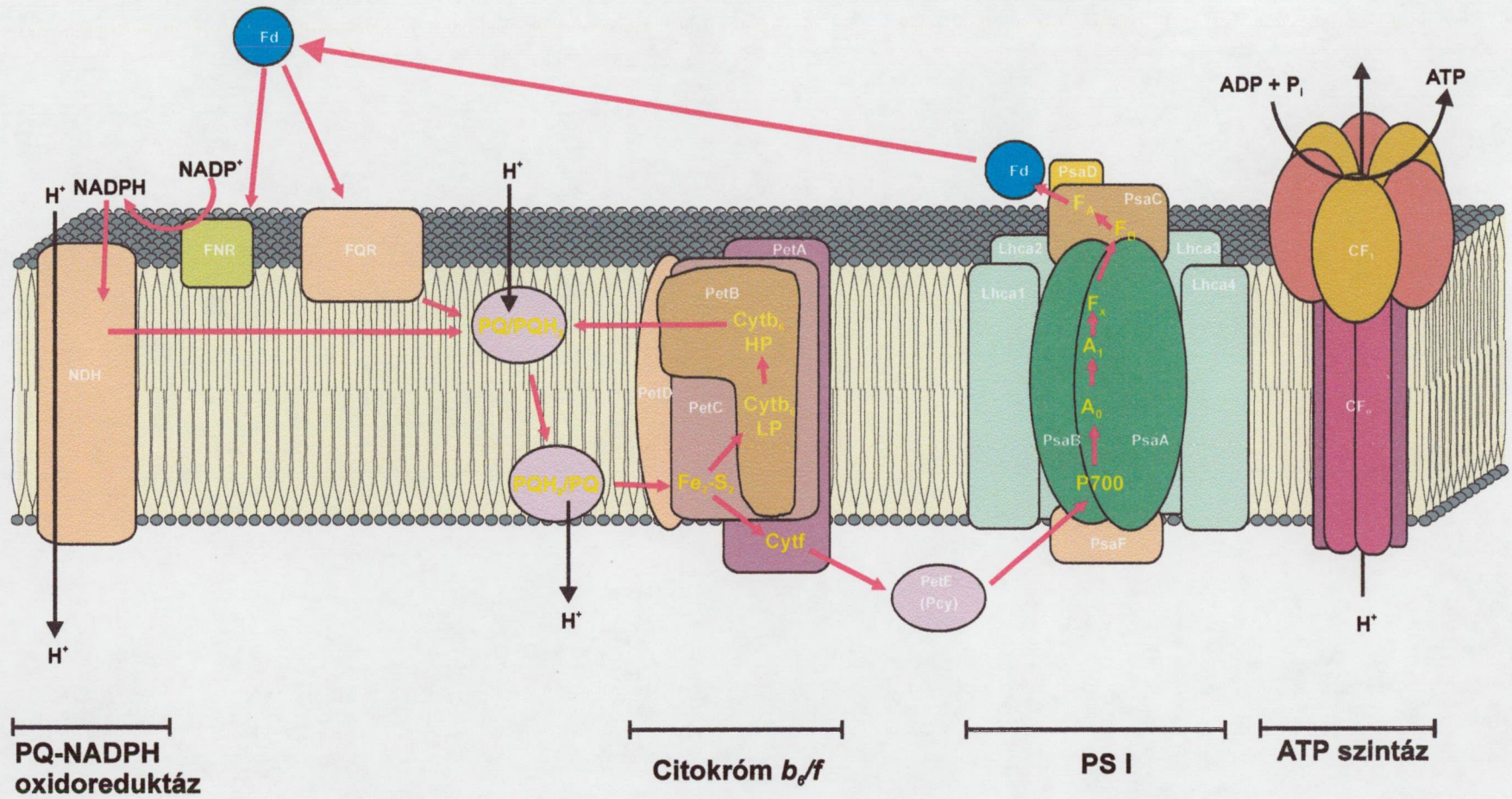
A PS I reakciócentrumát a kloroplasztiszban kódolt PsaA és PsaB fehérjék dimerje alkotja. Ez tartalmazza a primer donort, a P700-at, amely egy klorofill  $\alpha$  dimer. A heterodimeren található az elsődleges ( $A_0$ ) és a másodlagos ( $A_1$ ) akceptor ill. egy vas-kén centrum, az  $F_X$  is. A PS II-vel ellentétben a PS I reakciócentruma tartalmazza a PS I belső antennáját képező klorofill  $\alpha$  és  $\beta$ -karotin molekulákat is. A további elektron akceptorok, az  $F_A$  és  $F_B$ , melyek szintén vas-kén centrumok, már egy másik fehérje alegységen, a PsaC-n találhatók. A megvilágítás hatására oxidálódott P700 a plasztocianninnal redukálódik vissza. A PS I redoxkomponensein végighaladó elektronok egy vízoldható ferredoxinra jutnak, amely enzimatikus úton redukálja a  $NADP^+$ -t NADPH-vá.

A három fotoszintetikus komplex különböző kombinációival a kloroplasztiszban különböző elektrontranszport utak valósulhatnak meg, amelyek eltérő arányban biztosítják az ATP-t és NADPH-t. A PS II, a citokrom *b<sub>6</sub>/f* komplex és a PS I sorbakapcsolásával egy lineáris elektrontranszport megy végbe, amely a víztől a  $NADP^+$ -ig tart (1. ábra). A lineáris elektrontranszporthoz, egy a membránon keresztüli proton transzport kapcsolódik, amely proton grádienszt épít fel a membrán két oldalán. Egyetlen elektronnak a végighaladása a lineáris elektrontranszportláncon 3 proton akkumulációját eredményezi a tilakoid lumenében (Hope és mtsai., 1985; Rich, 1991). Az így felépülő proton grádiens biztosítja az energiát az ATP-szintáz működéséhez. Egy molekula ATP képződéséhez korábbi mérések szerint 3 (Witt, 1975; Portis és McCarty, 1976), újabb mérések szerint 4 proton (Gräber és mtsai.,

1987; Rumberg és mtsai., 1990; Pueyo és Gómez-Moreno, 1991) áthaladása szükséges a lumenből a sztrómába az ATP-szintázon keresztül. 4 H<sup>+</sup>/ATP arány mellett a lineáris elektrontranszport az ATP-t és NADPH-t 3:2 arányban állítja elő, ami éppen megfelel a Calvin-ciklus ATP/NADPH követelményének steady-state körülmények között.

A lineáris elektrontranszport mellett kéalgákban és növényekben egyaránt kimutatták egy ciklikus elektrontranszport létét is, amelynek működése ATP keletkezésével jár együtt (Arnon, 1959; Arnon, 1991). A ciklikus elektrontranszportot a PS I, a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex és a lineáris elektrontranszportéval megegyező, mobilis redoxkomponensek katalizálják, de a PS II nem vesz részt benne (2. ábra). A ciklikus elektrontranszport pontos útja még nem teljesen tisztázott, de az bizonyított, hogy a plasztokinontól a ferredoxinig tartó szakasza megegyezik a lineáris elektrontranszportéval. A ferredoxintól az elektron legalább két úton juthat vissza a plasztokinonhoz (Hosler és Yocum, 1985) amelyeknek különböző lehetséges módusulatait írták le az irodalomban. Az egyik lehetőség, hogy a ferredoxin enzimátikus úton, a ferredoxin-plasztokinon oxidoreduktáz (FQR) enzim közreműködésével, közvetlenül redukálja a plasztokinont. Az FQR aktivitás, amelyet Cleland és Bendall (1992) közvetlen módszerekkel is kimutatott, antimicin A antibiotikummal gátolható. Az antimicin A szenzitív út mellett létezik egy antimicin A rezisztens, de N-etil-maleimid (NEM) és rotenon szenzitív elektrontranszport út is. A NEM érzékenység a ferredoxin–NADP oxidoreduktáz (FNR) részvételét bizonyítja. Az FNR ferredoxin felhasználásával redukálja a NADP-t. A NADPH egy, a mitokondriumokban található NADH dehidrogenázzal homológ NAD(P)H-plasztokinon oxidoreduktáz enzim segítségével redukálja a plasztokinont. Tilakoid membránhoz kötött dehidrogenázok jelenlétére a





2. ábra. A ciklikus elektrontranszport és az abban résztvevő fehérje és mobilis elektrontranszport komponensek

klororespiráció vizsgálatai során derült fény. Az NDH aktivitást kéalgákban, zöldalgákban és magasabbrendű növények kloroplasztiszaiban egyaránt kimutatták (Godde és Trebst, 1980; Garab és mtsai., 1989; Mi és mtsai., 1992a, 1992b, 1995; Cuello és mtsai., 1995; Endo és mtsai., 1997). A NAD(P)H-plasztokinon oxidoreduktáz révén a PS I ciklikus elektrontranszportnak a klororespirációval is van egy közös szakasza. Más laboratóriumokban további alternatív PS I ciklikus elektrontranszport utakat is kimutattak (Jeanjean és mtsai., 1999; van Thor és mtsai., 2000). Mivel mindegyik reakcióút tartalmazza a cyt *b<sub>6</sub>f* komplexet, a ciklikus elektrontranszport membránon keresztüli proton transzferhez kapcsolt, így a ciklikus elektrontranszport is képes protongradiens kialakítására és ATP szintézisre (Bedell és Govindjee, 1973). A folyamat ciklusos jellegéből adódóan netto redukció nem történik, így a lineáris elektrontranszporttal szemben a ciklikus fotofoszforyláció nem jár együtt redukáló erő létrejöttével.

Annak ellenére, hogy izolált tilakoidon és kloroplasztiszbán a ciklikus elektrontranszportot már régen kimutatták, annak fiziológiai szerepe még nem teljesen tisztázott. Canaani (1990) *Dunaliella salinaban* a PS I ciklus indukcióját figyelte meg 4 M NaCl jelenlétében, míg *Chlamydomonasban* fotoinhibíció során figyeltek meg hasonló jelenséget (Canaani és mtsai., 1989 Topf és mtsai., 1992). Havaux (1992) magasabb rendű növényekben szintén kimutatta a PS I ciklus indukcióját fotoinhibíció során. A ciklikus elektrontranszport erősödése figyelhető meg alacsony CO<sub>2</sub> koncentráció mellett (Harbinson és Foyer, 1991), szárazságstressz hatására (Katona és mtsai., 1992) ill. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> asszimiláció során is (Turpin és Bruce, 1990). A fent említett körülmények között a sejtmétabolizmus fokozott ATP termelést igényel, amit a ciklikus elektrontranszporthoz kötött fotofoszforyláció biztosíthat. Ogawa és mtsai. (1985) kimutatták, hogy a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> koncentrálása alacsony CO<sub>2</sub> koncentráció

mellett ciklikus fotofoszfórilációhoz kötött. Kéalgákban a sóstressz által indukált  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport enzimek működéséhez szükséges fokozott ATP termelésben, a légzés mellett, a PS I által hajtott ciklikus elektrontranszportnak is szerepe van (Jeanjean és mtsai., 1993). Mindezen eredmények alapján a ciklikus elektrontranszport egyik lehetséges szerepe az ATP/NADPH arány beállítása a fokozott ATP felhasználásával járó körülmények között. A kloroplasztiszban a ciklikus fotofoszfórilációban termelt ATP kijuthat a sejt citoplazmájába és így közvetlenül is résztvehet a sejt teljes energizálásában (Yin és mtsai., 1991).

Heber és Walker (1992) javaslata szerint a PS I ciklus szerepe az, hogy stresszkörülmények között a PS II működését szabályozza. A PS I ciklus fotoprotektív szerepét bizonyították Heber és mtsai. (1995) spenót leveleken  $\text{CO}_2$  limitált körülmények között, erős fényben.

A ciklikus elektrontranszport, szemben a lineáris elektrontranszporttal, csak ATP termeléshez kapcsolt, így a ciklikus és a lineáris elektrontranszport arányának változtatásával a kloroplasztisz különböző NADPH/ATP arányokat képes kialakítani. A ciklikus és a lineáris elektrontranszport egymással versengő folyamatok. A ciklikus elektrontranszport kialakulásához az elektrontranszport komponensek meghatározott redox egyensúlyára van szükség (Chain és Arnon, 1977). Oxidatív körülmények között az elektronok elvonódnak a ciklusból, míg ha az elektrontranszportlánc komponensek túlságosan redukáltak az elektronok nem képesek a cikluson keresztül visszatérni a PQ poolba. A ciklikus elektrontranszport kialakulásának a magas NADPH/NADP<sup>+</sup> arány ill. a PQ pool oxidált állapota kedvez (Slovacek és mtsai., 1980; Takahama és mtsai., 1981). Ilyen körülmények között, Cha és Mauzerall (1992) szerint, a ciklikus elektrontranszport kialakulása pusztán kinetikai okokra vezethető vissza, míg Hosler és Yocum (1987) feltételezik, hogy a ciklikus/lineáris

elektrontranszport arányt a NADPH az FNR enzimre gyakorolt allosztérikus hatásán keresztül is befolyásolja.

## **A két fotokémiai rendszer működésének összehangolása**

A fotoszintézis kvantumhatásfoka sok növényfajban megközelíti az elméletileg lehetséges maximális, 0,125 mol O<sub>2</sub>/mol foton értéket (Ley és Mauzerall, 1982; Björkman és Demmig, 1987). Ez a magas hatásfok nem képzelhető el olyan szabályozási folyamatok nélkül, melyek kellő rugalmasságot adnak a fotoszintetikus rendszernek ahhoz, hogy az állandóan változó környezeti körülmények között is képes legyen biztosítani az aktuális metabolikus folyamatok által megkövetelt ATP és NADPH mennyiséget. A természetes környezetben a fény intenzitása és spektrális összetétele folyamatosan változik. Alacsony fényintenzitás mellett a növénynek a lehető legtöbb fényenergiát kell összegyűjtenie, erős fényintenzitás mellett viszont a feleslegben elnyelt fényenergia, mely nem tud hasznosulni a biokémiai folyamatokban, károsíthatja a növényt. A két fotokémiai rendszer eltérő pigmentösszetételű, így abszorpciós spektrumuk és hatásspektrumuk is eltérő, ezáltal a fényviszonyokban bekövetkező változásokra eltérő módon reagálnak. A PS I elsősorban a klorofill *a* által elnyelt energiát hasznosítja, míg a PS II abszorpciójában a klorofill *a* és *b* formák megközelítőleg egyforma mértékben vesznek részt, így pl. a 680 nm hullámhosszúság feletti megvilágító fényben a PS II válik limitáló tényezővé. A két fotokémiai rendszer a köztes elektrontranszport komponensek által sorbakapcsolt, így a megfelelő fotoszintetikus hatásfok eléréséhez a két rendszer aktivitásának egyensúlyban kell lennie. Ha a kiegyenlítetlen gerjesztés miatt valamelyik rendszer működése meghaladja a másik kapacitását, akkor a túlgerjesztett



rendszerben elnyelt feles mennyiségű energia disszipálódik és rontja a fotoszintézis kvantumhatásfokát. A két rendszer kiegyenlítetlensége a köztes elektrontranszport komponensek túlságosan oxidált vagy redukált állapotához vezethet, amely a növény károsodását okozhatja. A nagymértékű redukció gátolja a nagy redoxérzékenységű PS I körüli ciklikus elektrontranszportot, megzavarva ezáltal a lineáris és ciklikus elektrontranszport egyensúlyát, lehetetlenné téve a szükséges ATP/NADPH arány kialakítását és a rendszer alkalmazkodását a metabolikus követelményekhez.

A fényviszonyok mellett, a növény tápanyag ellátottsága is változhat, ami a növényi sejt, különösen a nagy metabolikus flexibilitással rendelkező algák fiziológiai állapotát befolyásolja. Az intermedier anyagcsere változása megnövelheti az ATP és/vagy a NADPH fogyasztást, elektronokat vonhat el, vagy redukáló erők termelésével, a klororespiráción keresztül elektronokat táplálhat a fotoszintetikus elektrontranszport láncba, ami ugyancsak a két fotokémiai rendszer redox egyensúlyának a megbomlását eredményezi.

A két fotokémiai rendszer redox egyensúlyában a környezeti tényezők által kiváltott zavarok kiküszöbölésére az evolúció során többféle mechanizmus alakult ki, amelyek mind rövid, mind hosszú távú alkalmazkodást tesznek lehetővé. A két fotokémiai rendszer működésének egybehangolása alapvetően két mechanizmussal, az elnyelt fényenergia két rendszer közötti eloszlásának változtatásával ill. a két fotoszisztéma sztöichiometriai arányának változtatásával történhet.

### **Az elnyelt fényenergia eloszlásának szabályozása a két fotokémiai rendszer között**

Az elnyelt fényenergia megoszlásának szabályozását a növényeknek a fény spektrális összetételéhez történő alkalmazkodása során részletesen tanulmányozták.

Először Murata (1969) ill. Bonaventura és Myers (1969) figyelte meg vörös- és zöldalgákon a state átmeneteknek nevezett jelenséget. Ha algákat előzetesen hosszabb ideig olyan fényel világították meg, melyet a PS I nagyobb mértékben nyel el mint a PS II (PS I fény), akkor az oxigénfejlesztés hatásfoka nagyobb volt PS I fényben mérve mint rövid PS II megvilágítás esetén. Hosszabb, több percig tartó PS II fényel történő megvilágítás után mérve azonban a PS II fényre nézve megnőtt a fotoszintetikus aktivitás hatásfoka és a PS I gerjesztéssel mért hatások voltak alacsonyabbak. Az oxigénfejlődés mellett, a klorofill fluoreszcenciában is jellegzetes változások figyelhetők meg. A PS I fényhez adaptált algáknál a szobahőmérsékleten mért fluoreszcencia magasabb hatásfokú mint a PS II fényhez adaptált sejtekben. A 77 K-en mért emissziós fluoreszcencia spektrumokban a PS II-höz rendelt sávok PS II fényben lecsökkennek, míg a 715 nm-es PS I sáv megnő (Bennett és mtsai., 1980). PS I fényben az ellenkező irányú folyamatok játszódnak le. A PS I fényben kialakuló állapotot state 1-nek, míg a PS II fényben megfigyelhető state 2-nek nevezték el. A state átmenetek során a fluoreszcencia és az oxigén fejlődés kvantumhatásfokában bekövetkező változások azt mutatják, hogy az elnyelt fényenergiának a két fotokémiai rendszer közötti eloszlása megváltozott oly módon, hogy az adott megvilágítás mellett a fény limitált fotokémiai rendszer az elnyelt fényenergiának nagyobb hányadából részesül a másik fotokémiai rendszer rovására. PS I fényben a PS II, míg PS II fényben a PS I válik kedvezményezetté az abszorbált fényenergia hasznosításában, annak érdekében, hogy csökkenjen a két rendszer kiegyensúlyozatlansága.

Bennett (1979, 1980) kimutatta, hogy a klorofill fluoreszcencia változások a state 1/ state 2 átmenet alatt az LHC II reverzibilis foszforilációjával járnak együtt. A foszforilációt egy tilakoid membránhoz kötött fényfüggő kináz enzim végzi. A foszforiláció növeli, a defoszforiláció csökkenti a PS I részesedését az elnyelt

fényenergiából. Az LHC II alacsony foszforiláltágu állapota megfelel a state 1 (Bennett, 1991), míg az LHC II foszforilációja a state 2 (Allen, 1992) állapotnak.

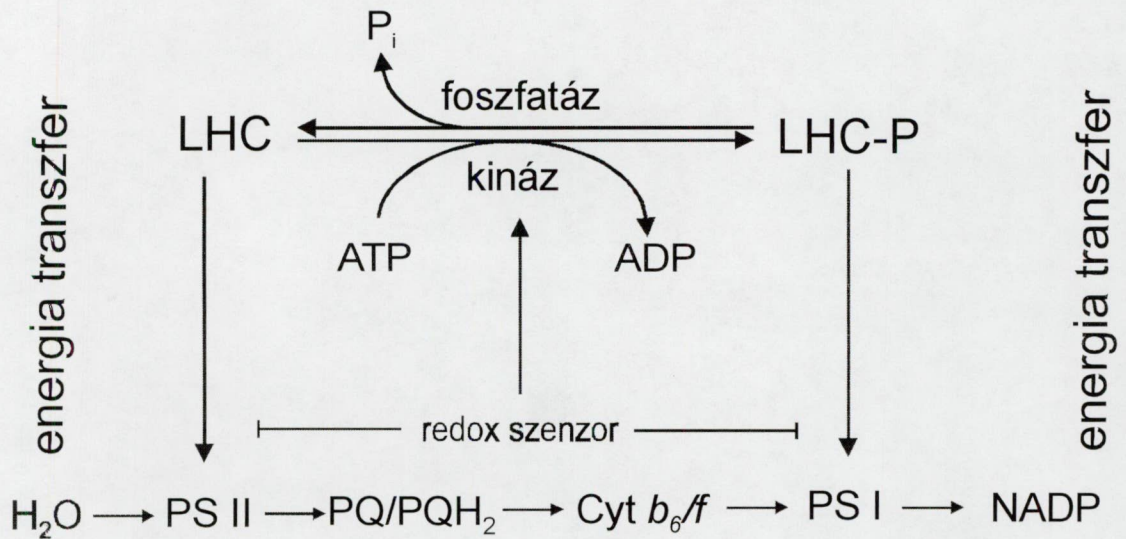
Nem teljesen tisztázott az a molekuláris mechanizmus, amely az LHC II foszforilációja révén a PS I és PS II közötti energiamegoszlás megváltozásához vezet. Allen és Melis (1988) valamint Haworth és Melis (1983) javaslata alapján foszforilált állapotban lecsökken az LHC II affinitása a PS II-hez és ennek következtében az LHC II ledisszociál a fehérjekomplexről, csökkentve ezáltal annak abszorpciós hatáskeresztmetszetét és így a PS II reakciócentrumához továbbított fényenergia mennyiségét. Más szerzők 77 K-es fluoreszcencia (Krause és Behrend, 1983) ill. fotoakusztikus mérések alapján (Canaani és mtsai., 1984; Delosme és mtsai., 1994, 1996), valamint a PS I state 1 és 2 állapotban mért kvantumhatásfokának összehasonlítása alapján (Horton és Black, 1982; Telfer és mtsai., 1984) arra következtetnek, hogy a PS II-ről ledisszociált LHC II a tilakoid membránban a PS I-hez vándorol és a továbbiakban a PS I reakciócentrumához továbbítja az elnyelt fényenergiát.

A fény által kiváltott adaptációs mechanizmus sötétben is szimulálható olyan redukálószerekkel, melyek képesek redukálni az intermedier elektrontranszport komponenseket, ill. az LHC II kináz aktiválása gátolható az elektrontranszport komponensek kémiai oxidációjával (Bennett, 1980; Allen és mtsai., 1981). Azóta cianobaktériumokban (Bennett, 1991; Allen, 1995) és vörösalgákban (Biggins és mtsai., 1984) is kimutatták a redox szabályozott state átmeneteket.

A state átmenetek kiválthatók olyan metabolikus folyamatok indukálásával is, amelyek a fotoszintetikus elektrontranszportlánc redukcióját okozzák. Gans és Rebeille (1990) a mitokondriális elektrontranszport gátlásával serkentette a glükolízist *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában. Turpin és Bruce (1990)  $\text{NO}_3^-$

asszimilációról  $\text{NH}_4^+$  asszimilációra való áttérésnél figyelt meg state 1/state 2 átmenetet *Selenastrum minutum* zöldalgában. Ezek alapján feltételezhető, hogy a state átmenetek a kromatikus adaptáció mellett a metabolikus folyamatokhoz való alkalmazkodásban is szerepet játszanak. A state 1/state 2 átmenet a PS I elektrontranszport kapacitásának növelésével kedvező lehet minden olyan metabolikus folyamat számára, amely fokozott ATP és csökkent NADPH termelést igényel és ennél fogva egy PS I által hajtott ciklikus elektrontranszport működését részesíti előnyben. A fényhez hasonlóan a metabolikus folyamatok is valószínűleg az elektrontranszport redoxállapotára gyakorolt hatásukon keresztül befolyásolják az elnyelt fényenergiának a két fotokémiai rendszer közötti eloszlását. A 3. ábra összefoglalja a state átmenetek magyarázatára általánosan elfogadott modellt. Ha a PS II fokozott működése vagy valamilyen külső forrásból származó elektron beáramlás miatt az intermedier elektrontranszport komponensek kiredukálódnak, akkor a redox szenzitív LHC II kináz enzim aktiválódik. A kináz az LHC II-t ATP felhasználásával az N-terminális végen egy treonin aminosav oldalláncon foszforilálja. A foszforilált LHC II ledisszociál a PS II-ről, ezáltal csökkenti annak abszorpciós hatáskeresztmetszetét, és így a PS II aktivitását is (state 1/state 2 átmenet). Az LHC II a PS I-hez kapcsolódva, az általa elnyelt fényenergiát már a PS I reakciócentrumához, a P700-hoz fogja továbbítani, serkentve annak működését, és helyreállítva ezáltal az elektrontranszport egyensúlyát. Ha a PS I fokozott működése miatt a PQ vagy citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex tartósan oxidált állapotba kerül, akkor az előzőekkel ellentétes folyamatok játszódnak le. A kináz inaktíválódik és egy folyamatos működésű foszfatáz enzim defoszforilálja az LHC II-t (Silverstein és mtsai., 1993; Elich és mtsai., 1997). A defoszforilált LHC II újra a PS II-höz kapcsolódik (state 2/state 1 átmenet). Nem tisztázott, hogy a kináz aktiválásához

vezető jelátviteli folyamatban a PQ vagy a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex játsza-e a redox szenzor szerepét, ill. melyikük redoxállapota a meghatározó. Allen és mtsai. (1981) ill. Horton és Black (1981) elektrontranszport gátlók alkalmazásával végzett



3. ábra. A state átmenetek redox szabályozásának modellje.

vizsgálataik alapján a plasztokinont tekintik a redox szenzornak, amely a kináz enzimet aktiválja. Mások (Gal és mtsai., 1988; Bennett és mtsai., 1988; Coughlan és mtsai., 1988; Wollman és Lemaire, 1988) citokróm *b<sub>6</sub>/f* hiányos mutánsokban nem tudták előidézni sem a state 1/state 2 átmenetet, sem a kináz enzim aktiválását, még redukált plasztokinon jelenlétében sem, ami arra utal hogy a jelátvitelben a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex játszik szerepet. Vener és mtsai. (1995, 1997) rövid ideig tartó alacsony pH kezeléssel a PQ redukcióját és az LHC II kináz aktiválását tudta előidézni. Az eredeti pH érték visszaállítása után a PQ gyorsan és teljes mértékben visszaoxidálódott, azonban a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex redukált maradt és a kináz aktivitás is magas értéken maradt. A kináz aktivitás egyetlen fényfelvillanással, amely a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex  $Q_o$  kötőhelyén megkötött redukált plasztokinon molekulát



oxidálja, megszüntethető volt, így feltételezhető hogy a kináz enzim aktivitásához a  $Q_0$  kötőhely betöltöttsége szükséges. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy  $Q_0$  kötőhelyre mutáns *Chlamydomonas reinhardtii* alga nem mutat state átmeneteket (Zito és mtsai., 1999). Fiziológias körülmények között önmagában sem a PQ, sem a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex nem képes a kináz aktiválására. A redukált plasztokinon valószínűleg a redox mediátor szerepét játsza, amely közvetíti az elektron transzport redox állapotát, a tényleges redox aktívátorhoz, amire a legalkalmasabb jelöltnek a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex tűnik.

## **A két fotokémiai rendszer mennyiségi arányának szabályozása**

A fotoszintézis két fotokémiai rendszere az elektrontranszport által sorbakapcsolt, így sokáig feltételezték hogy a két rendszer azonos mennyiségben fordul elő a tilakoid membránokban (Haehnel, 1976; Whitmarsh és Ort, 1984). A folyamatos elektrontranszport fenntartásához a két rendszer által transzportált elektronok számának azonosnak kell lennie, így olyan körülmények között, ahol a két fotokémiai rendszer aktivitása eltérő, a két rendszer sztöichiometriai aránya sem szükségszerűen egységnyi. Míután a PS I és PS II mennyiségének meghatározására alkalmas spektroszkópiai technikák elérhetővé váltak, számos adat gyűlt össze a különböző rendszertani hovatartozású és eltérő élőhelyeket benépesítő fotoszintetizáló szervezetek tényleges fotoszisztéma arányaira vonatkozóan (2. táblázat). Először cianobaktériumok tanulmányozása során derült fény arra, hogy a PS I mennyisége jóval meghaladhatja a PS II mennyiségét (Fujita, 1976) és a PS I/PS II arány még ugyanazon faj esetében is függ a fényintenzitástól (Kawamura és mtsai., 1979; Murakami és Fujita, 1991; Aizawa és mtsai., 1992), valamint a nevelőfény spektrális

összetételétől (Myers és mtsai., 1980; Fujita és mtsai., 1985; Manodori és Melis, 1986; Melis és mtsai., 1989). Melis és Brown (1980) ill. Melis és Thielen (1980) kiterjesztette a vizsgálatokat zöld növényekre is, és megállapították hogy a PS II/PS I arány különböző fajok kloroplasztiszaiban széles tartományban (0,43-3,3) változik.

2. táblázat. A PS II/PS I aránya különböző rendszertani csoportba és élőhelytípusba tartozó szervezetekben.

csoport	Organizmus	PS II/ PS I	Referencia
Kékgalgák	<i>Anabena cylindrica</i>	2,82	Kawamura és mtsi 1979
	<i>Anabena variabilis</i>	2,04	Kawamura és mtsi 1979
	<i>Anacystis nidulans</i>	2,35	Kawamura és mtsi 1979
	<i>Synechococcus lividus</i>	0,43	Melis és Brown 1980
Zöldalgák	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,33	Neale és Melis 1986
	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,92	Greenbaum és Mauzerall 1991
	<i>Dunaliella teriolata</i>	0,91	Falkowski és mtsi. 1981
	<i>Dunaliella salina</i>	1,4	Melis 1990
Hajtásos növények	<i>Spinacia oleracea</i>	1,23	Chow és Hope 1989
	<i>Hordeum vulgare</i>	0,62	Burkey 1993
	<i>Arabidopsis thalina</i>	1,61	Walters és Horton 1994
	<i>Pisum sativum</i>	0,77	Melis és Brown 1980
	<i>Spinacia oleracea</i>	1,43	Melis és Brown 1980
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,67	Melis és Harvey 1981
	<i>Atriplex triangularis</i>	2,08	Melis és Harvey 1981
Árnnyektűró	<i>Asarum caudatum</i>	2,74	Melis és Harvey 1981
	<i>Polystichum munutum</i>	3,88	Melis és Harvey 1981
	<i>Tolmiea menziesii</i>	2,42	Melis és Harvey 1981

A kék- és vörösalgákhoz hasonlóan a zöldalgák és magasabb rendű növények PS II/PS I sztöichiometriája is függ a fényviszonyoktól. A növekvő fényintenzitás növeli a tilakoid membránok P700 tartalmát (Leong és Anderson, 1983; Wilhelm és Wild, 1984). A PS I-et preferenciálisan gerjesztő távoli-vörös fényben gazdag megvilágítás esetén a PS II reakciócentrumok száma megnő, míg a PS I reakciócentrumok száma lecsökken a távoli-vörös fényt nem tartalmazó fényben.

nevelt növényekhez viszonyítva (Melis és Harvey, 1981; Melis, 1984; Glick és mtsai., 1985; Kim és mtsai., 1993). Whitmarsh és Ort (1984) megkérdőjelezte az abszorpció változásokon alapuló reakciócentrum szám meghatározást, azonban a reakciócentrum fehérjék natív és denaturáló körülmények között végzett elektroforetikus és immunológiai mennyiségi meghatározása megerősítette a funkcionális elemek (P700, Q<sub>A</sub> és citokróm *b<sub>559</sub>*) spektroszkópiai meghatározásán alapuló eredményeket. A PS II-nek a PS I-hez viszonyított erősebb gerjesztése hosszú távon megnöveli a PS I felépítésében résztvevő apoproteinek mennyiségét a PS II fehérjékhez képest (Eskins és Duysen, 1984; Glick és mtsai., 1985; Deng és mtsai., 1989; Kim és mtsai., 1993; Melis és mtsai., 1996).

A PS I és PS II mennyiségi változásaival arányosan változik az egyes fotokémiai rendszerek által katalizált elektrontranszport kapacitása is (Glick és mtsai., 1985), így a két rendszer egyenlőtlen gerjesztését okozó körülmények között is a kevesebb fényenergia elnyelésére képes rendszer meg tud felelni a másik rendszer elektron követelményeinek. Cianobaktériumokra (Myers és mtsai., 1980; Murakami és Fujita, 1988; Melis és mtsai., 1989; Murakami és Fujita, 1991) ill. növényekre (Chow és mtsai., 1990; Melis és mtsai., 1996) direkt módon bizonyították, hogy a fotokémiai rendszerek arányának változtatása valóban olyan mechanizmust jelent, amely képes a két rendszer kiegyensúlyozatlanságának kompenzálására és az elméleti maximumhoz közeli kvantumhatásfok biztosítására.

A fehérjék mennyiségét a szintézisük és degradációjuk sebessége határozza meg. *Synechocystisben* Fujita és mtsai. (1988) tanulmányozták a PS II és PS I fehérjék szintézisét különböző spektrális eloszlású fényben nevelt algasejtekben. A PS I/PS II arány növekedése a PS II-t kitüntetetten gerjeszteni képes fényben elsősorban a PS I fehérjekomplex mennyiségének növekedéséből adódott, és a PS I komplex

mennyisége inkább az abban résztvevő fehérjék szintézis sebességének növekedése miatt változott, mintsem a fehérjék degradációjának lassulása következtében. Azonos eredményre jutott Aizawa és Fujita (1997) is, akik azt is megállapították, hogy a *PsbA* protein szintézise *Synechocystisben* translációs vagy poszt-transzlációs szinten szabályozódik, mivel a *psbA* gén transzkript szintje nem különbözik az eltérő PS I/PS II arányt kialakító fényviszonyok mellett nevelt algasejtekben. Ezzel szemben Glick és mtsai. (1986) vörös (PS I) és sárga (PS II) fényben nevelt borsóban korrelációt kapott a PS I/PS II arány és az azok felépítésében résztvevő gének (*psaA*, *psbA*) transzkript szintjeinek aránya között. Deng és mtsai. (1989) összehasonlították ugyanezen gének transzkripció aktivitását vörös és sárga fényen nevelt spenótban. A *psaA* gén kivételével a transzkripció sebessége nem változott, így az mRNS-ek mennyiségének változása valószínűleg a transzkriptek stabilitásában bekövetkezett változásoknak köszönhető.

A PS I/PS II sztöichiometria változás az elektrontranszport egyensúlyának fenntartását szolgálja, így kézenfekvő volt a feltételezés, hogy a két fotokémiai rendszer aránya az elektrontranszport lánc redox állapotának szabályozása alatt áll. Melis és mtsai. (1985) feltételezték, hogy az elektrontranszport két termékének, az ATP-nek és a NADPH-nak a koncentrációja ill. azoknak aránya befolyásolja a PS I/PS II arányt kialakító gének expresszióját. Kékalgákon végzett vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy az elektrontranszport komponensek redox állapota és a PS I/PS II arány között közvetlen kapcsolat van. Különböző trofikus- és fényviszonyok között nevelt *Synechocystis* PCC6714 cianobaktériumban a PQ ill. citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex növekvő redukáltságával egyenes arányban változott a PS I/PS II arány (Fujita és mtsai., 1987; Fujita és Murakami, 1987; Murakami és Fujita, 1991). A fotoszintetikus fehérjék *de novo* szintézise és az

elektrontranszportlánc komponenseinek redox állapota közötti kapcsolatot többféle mechanizmus is biztosíthatja. Danon és Mayfield (1991, 1994a, 1994b) ill. Kim és Mayfield (1997) részletesen feltárták a fény/sötét átmenetnek a *psbA* gén expressziójára gyakorolt hatását kloroplasztiszban. A megvilágítás hatására a PS I akceptor oldalán elhelyezkedő ferredoxin redukálódik. A redukált ferredoxin felhasználásával a ferredoxin-tioredoxin reduktáz enzim közvetlenül redukál egy, a kloroplasztiszban elhelyezkedő, protein diszulfid izomeráz (cPDI) enzimet. A cPDI viszont egy poliadenilát kötő fehérje a cPABP vicinális tiolcsoportját redukálja. A cPABP redukált formában hozzákötődik a *psbA* mRNS 5'-végi nem transzlálódó szakaszához, ami szükséges a *psbA* mRNS transzlációjának megindításához. Ez a mechanizmus közvetlen kapcsolatot biztosít az elnyelt fényenergia mennyisége, ill. az által kialakított redox körülmények, és a PsbA fehérje szintézis sebessége között. Sötétben a kloroplasztiszban oxidatív körülmények alakulnak ki. A cPDI és ezáltal a cPABP fehérjék tiolcsoportjai oxidálódnak és a transzláció sebessége lecsökken. A fény hatását a cPDI fehérje ADP-függő foszforilációja is modulálja. A sötétben megnövekvő koncentrációjú ADP a cPDI fehérje foszforilációját váltja ki, ami fokozza a cPABP fehérje cPDI általi oxidációját. A fény/sötét átmenettel szemben a fény intenzitásának és spektrális eloszlásának változása által kiváltott hatások a state átmenetekhez hasonlóan, a két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő elektrontranszport komponensek redoxállapotával hozhatók összefüggésbe.

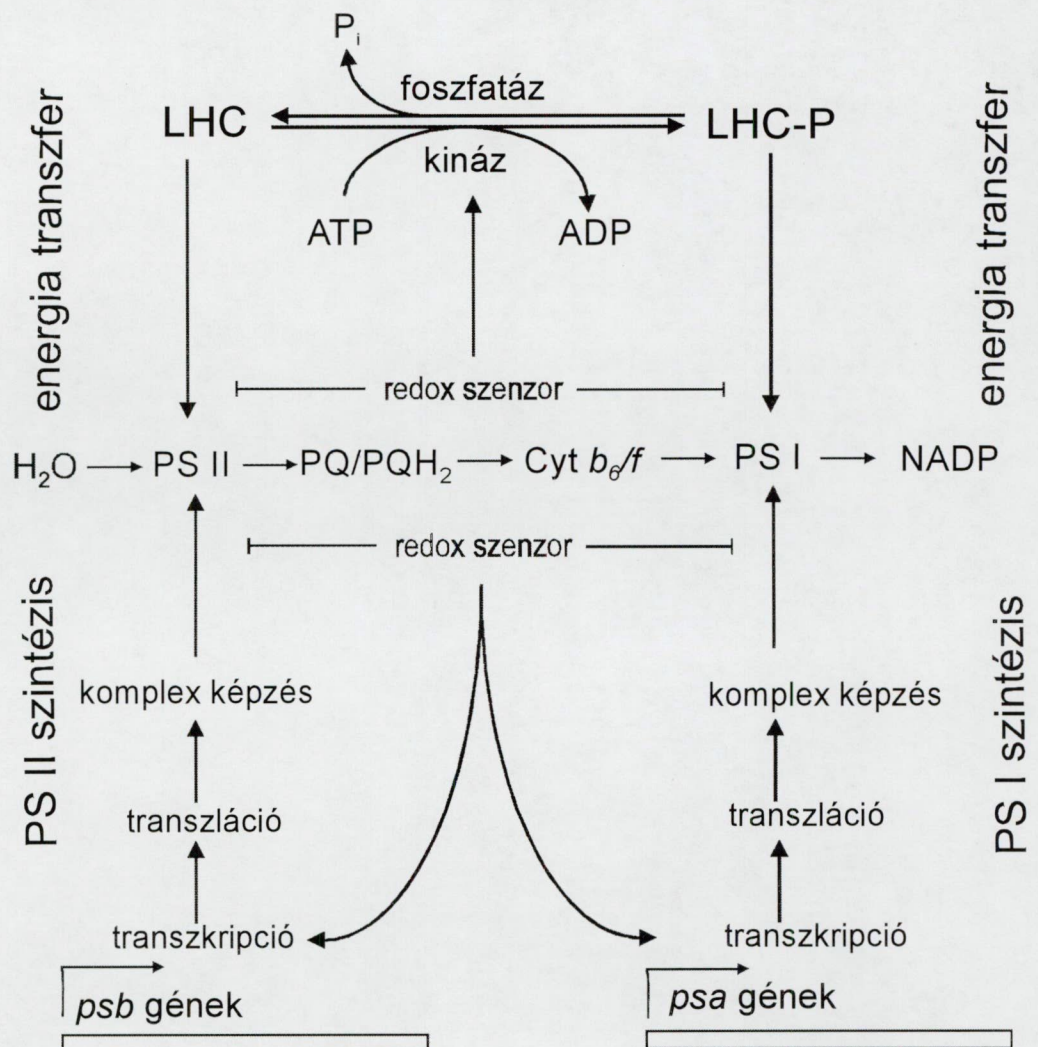
Escoubas és mtsai. (1995) az LHC II fehérjéket kódoló sejtmagban elhelyezkedő *cab* gének expresszióját tanulmányozta különböző fényintenzitáson nevelt *Dunaliella tertiolecta* zöldalgában. A fény itt, egy a PS II és a PS I közötti elektrontranszport komponens, a PQ redox állapotán keresztül szabályozza a *cab* gének transzkripcióját. A PQ redukciója egy foszforilációs kaszkádot vált ki, amely egy *cab* gén repressziós



faktort (CRF) aktívál. A CRF foszforilált formában a sejtmagba jutva a *cab* gén promoteréhez kötődve gátolja a transzkripciót.

A PS I/PS II sztöichiometria változások és a state átmenetek több közös vonást mutatnak. Mindkettő az adott körülmények között elérhető maximális kvantumhatásfok elérését biztosítja a két fotokémiai rendszer által katalizált elektron transzport sebességek arányának optimális beállításával. A két folyamat párhuzamosan, azonos irányban hatva, bár különböző időskálán játszódik le. A state átmenetek gyors, néhány perc alatt lezajló alkalmazkodást tesznek lehetővé, míg a két fotokémiai rendszer arány változása, lassúbb, órák, esetleg napok alatt bekövetkező adaptációt biztosít. Mindkét folyamat redox szabályozás alatt áll, továbbá mindkét esetben kimutatható a protein kinázok részvétele a jelátviteli folyamatokban. Ezen működési és szabályozási hasonlóságok alapján Allen (1992, 1995) a state átmenetek szabályozására felállított és széleskörben elfogadott modellt kiterjesztette a PS I/PS II sztöichiometria szabályozására is (4. ábra). Ebben a modellben a PQ vagy a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex redukciója egy vagy több kináz enzim aktíválását eredményezi. A kináz enzim(ek) egyrészt a PS I és PS II komplexeket alkotó fehérjéket foszforilálják, befolyásolva ezzel azok lebomlási sebességét, másrészt olyan fehérjéket foszforilálnak, melyek translációs és transzkripciós szinten hatnak a két fotokémiai rendszer génjeinek expressziójára. A redukzív körülmények között foszforilált PS II fehérjék lebomlása gyorsul, míg ugyanezen fehérjék génjeinek transzkripciója és/vagy translációja a foszforilált represszor fehérjék hatására csökken. Ezzel párhuzamosan a PS I fehérjék stabilitása fokozódik, szintézisük és fehérjekomplexszé történő összeállásuk sebessége gyorsul. Oxidatív körülmények között ezzel ellentétes folyamatok játszódnak le. A jelátviteli folyamatot megindító redox szenzor a modell szerint megegyezik a state átmenetek kiváltásában résztvevő

redox szenzorral. Pfannschmidt és mtsai. (1999) korrelációt mutattak ki a PQ redukciója és a *psbA* ill. *psaA* gén transzkripciója között PS I és PS II fényben nevelt mustár növényekben, míg Murakami és Fujita (1993) a PS I/PS II arányváltozás HQNO érzékenysége alapján a citokróm *b<sub>6</sub>*-ot azonosította redox szenzorként *Synechocystis*ben. A redukció hatására számos protein foszforilálódik, de ezek foszforilációs kinetikája különböző, így valószínűleg többféle enzim vesz részt a folyamatban. Néhány, pl. a 9 kD-os foszfoprotein foszforilációs sebessége olyan



4. ábra. A state átmenetek és a PS I/PS II sztöichiometria redox szabályozására felállított hipotetikus modell vázlata.

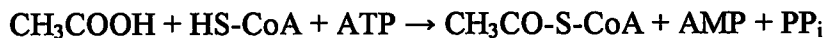
lassú, hogy a state átmenetek kiváltásában közreműködő kináz szerepe kizárható (Sanders és mtsai., 1989), de elég gyors ahhoz, hogy a lassúbb kinetikájú PS I/PS II arányváltozással kapcsolatba hozható legyen (Giardi, 1993).

Kéalgákban a kromatikus adaptáció mellett a fotokémiai rendszerek sztöichiometriájának szabályozása szerepet játszik más, az elektrontranszport egyensúlyát ugyancsak megzavaró környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásban is. A CO<sub>2</sub> mint szénforrás helyettesítése HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-tal (CO<sub>2</sub> stressz) (Melis és mtsai., 1985) vagy a nevelő közeg sókoncentrációjának növelése (só stressz) (Jeanjean és mtsai., 1993; Hibino és mtsai., 1996) a PS I/PS II arány növekedését eredményezi. Mind a só stressz, mind a CO<sub>2</sub> stressz fokozott ATP termelést tesz szükségessé. A megnövekedett ATP igényt a ciklikus fotofoszfóriláció kapacitásának növelésével elégítheti ki a növény. A ciklikus elektrontranszport kialakulásának kedvez a PS I komplexek számának növekedése a PS II-éhez viszonyítva. A fenti példák alapján a fotokémiai rendszerek sztöichiometriai arányának redox függő szabályozása a state átmenetekkel együtt olyan általános mechanizmusra utal, amely túlmutat a fényviszonyokhoz való alkalmazkodáson, és valószínűleg minden olyan változásban (stressz hatások, metabolikus változások, fény és klimatikus viszonyok, egyedfejlődés szakaszok) szerephez jut, ahol a két fotokémia rendszer működésének dinamikus változásaira van szükség a növényi sejt energia és metabolikus egyensúlyának zavartalan fenntartásához.

### ***Chlamydotrys stellata***

A *Chlamydotrys stellata* a volvocales rendbe tartozó ostoros, egysejtű zöldalga. A magasabb rendű növényekhez és más zöldalgákhoz hasonlóan, a *Chlamydotrys*

*stellata* autotróf körülmények között két fotokémiai rendszerrel rendelkezik, oxigént fejleszt és széndioxidból szénhidrátokat szintetizál a Calvin ciklusban. Ha a CO<sub>2</sub> helyett szénforrásként acetátot biztosítunk számára, az alga fotoheterotróf életmódra tér át (Wiessner, 1968). A fotoheterotróf életmód során az acetátot szénhidrátokká alakítja (5. ábra). Az acetát asszimiláció első lépéseként, a sejtbe került acetát, acetyl-CoA szintáz hatására, aktív acetáttá alakul az alábbi egyenlet szerint:

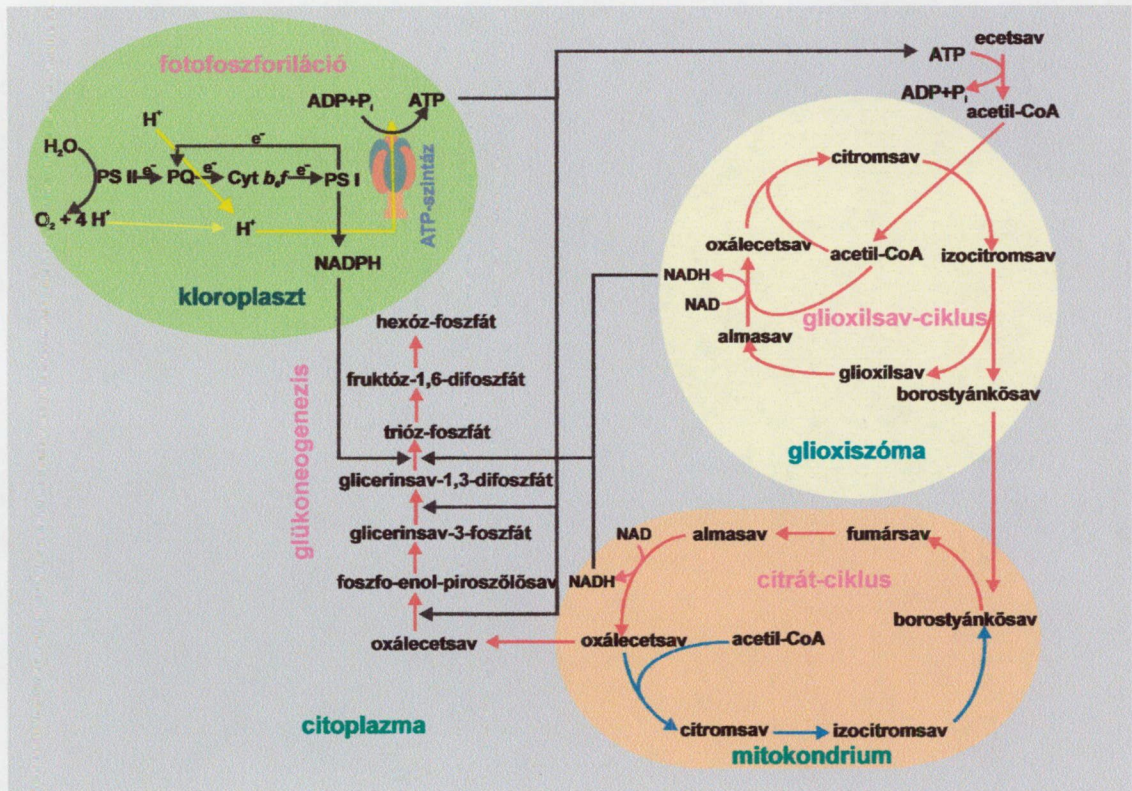


A folyamatot a PP<sub>i</sub> hidrolízise teszi egyirányúvá. A másik termék, az AMP az adenilát kináz hatására refoszforilálódik egy újabb molekula ATP felhasználásával, így az acetátmolekula aktiválása meglehetősen energia igényes folyamat. Az acetyl-CoA a sejt glioxiszómáiban lezajló glioxilsav ciklusban alakul tovább. Minden egyes ciklusba két acetyl-CoA molekula lép be és egy molekula borostyánkősav ill. redukált NADH keletkezik. A borostyánkősav a mitokondriumban alakul tovább oxálecetsavvá, amely további NADH képződéssel jár. Az oxálecetsavból a glükoneogenezis során a sejt citoplazmájában hexóz-monofoszfátok képződnek, ami további 2 ATP felhasználást jelent. A glioxilsavciklusban képződött négy NADH molekulából kettő a glükoneogenezisben hasznosul, de a maradék 2 molekula még mindig netto NADH képződést jelent. Az acetát fotoasszimiláció végső energiamérlege 12 ATP felhasználása és 2 NADH képződése egyetlen hexóz-monofoszfátra vonatkoztatva, szemben a Calvin ciklussal, ahol egyetlen fruktóz-foszfát képződéséhez a 18 ATP mellett 12 NADPH-ra is szükség van.

Eltérően a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgától, amely a CO<sub>2</sub>-ot eltérő metabolizmussal, indirekt módon asszimilálja, a *Chlamydomonas stellata* az acetátot csak fényben képes szénforrásként hasznosítani. Az acetát metabolizmus fényfüggése



bizonyítja, hogy ebben az algában az acetát asszimilációja a fotoszintetikus apparátus működéséhez kapcsolt. Feltehetően a glioxilsav ciklus ATP igényét a PS I által katalizált ciklikus fotofoszforiláció biztosítja, amely lehetővé teszi az ATP termelését redukáló erők termelése nélkül. A ciklikus fotofoszforiláció szerepét az acetát fotometabolizmus hatásspektruma is alátámasztja (Wiessner, 1965).



5. ábra. A *Chlamydomonas stellata* acetát fotoasszimilációjának vázlata. Magyarázat a szövegben.

A *Chlamydomonas stellata* metabolikus státusza, az ATP és NADPH igénye, így a két fotokémiai rendszer egyensúlyát meghatározó feltételek is, a külső körülmények (fény és tápanyagforrások) változtatásával könnyen befolyásolható, így ez az alga alkalmas rendszernek bizonyult, hogy tanulmányozzuk a metabolikus adaptációban résztvevő, a két fotokémiai rendszer működésének egybahangolását biztosító szabályozó mechanizmusokat.

## Célkitűzés

Munkánk során azokat a molekuláris redox szabályozási folyamatokat tanulmányoztuk, amelyek biztosítják a fotoszintézis két fotokémiai rendszerének összehangolt működését a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga metabolikus adaptációja alatt. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy:

1. a CO<sub>2</sub> fixációról az acetát metabolizmusra való áttérés során valóban megnövekszik-e a sejt ATP igénye a NADPH igényhez viszonyítva, ami megzavarhatja a két fotokémiai rendszer egyensúlyát, és az elektrontranszportlánc fokozott redukcióját okozhatja;
2. az elektrontranszportlánc komponenseinek redukciója a kromatikus adaptációhoz hasonlóan az LHC II foszforilációját és state 1/state 2 átmenetet indukál-e;
3. a redukció hosszú távon hogyan befolyásolja a két fotokémiai rendszert felépítő fehérjék génexpresszióját és mely elektrontranszportlánc komponens felelős a génexpresszió redox kontrolljáért;
4. a génexpresszió megváltozása következtében hogyan változik a PS I és PS II sztöichiometriai aránya;
5. a tilakoid membrán molekuláris átrendeződése és fehérje összetételének megváltozása az autotróf-fotoheterotróf átmenet során növeli-e az acetát fotometabolizmusának jobban megfelelő ciklikus elektrontranszport, ill. ciklikus fotofoszforiláció kapacitását.

## **Kísérleti anyagok és módszerek**

### ***Chlamydomonas stellata* nevelési körülményei**

*Chlamydomonas stellata* (strain 10-le, Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institute, Universität Göttingen) zöldalgát  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fehér fényen,  $28^\circ\text{C}$  hőmérsékleten, pH 6,8-en tenyésztettük. Az autotróf nevelésnél a tenyészeteket 5%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazó levegővel buborékolattuk. A fotomixotróf tenyészetekhez a  $\text{CO}_2$  buborékolatás mellett 20 mM Na-acetátot adtunk. Az alga által felhasznált acetátot 30 %-os ecetsavval póoltuk, amelyet egy automata buretta adagolt az acetát felvétellel járó pH emelkedésnek megfelelően. A ftoheterotróf alga tenyésztése a fotomixotróféval egyezett meg, azzal a kivétellel, hogy a tenyészetet  $\text{CO}_2$  mentes levegővel buborékolattuk. A levegőt 40%-os KOH oldaton való átbuborékolatással tettük  $\text{CO}_2$  mentessé.

### **Biokémiai módszerek**

#### **Tilakoid izolálás**

Az algát centrifugálás után 50 mM Tricin (pH 7,8) 10 mM NaCl/ 5 mM  $\text{MgCl}_2$ / 400 mM szaharóz tartalmú médiumban mostuk, majd centrifugálva, mégegyszer mostuk az előző médiummal, szaharóz nélkül. A sejteket ultrahanggal tártuk fel. A nagyobb sejtörmelékét 2 perc centrifugálással (1000xg ) eltávolítottuk. A felülúszót 10 perc 15000xg centrifugálással ülepitettük. Az üledéket szaharóz nélküli pufferben szuszpendáltuk.

### **Klorofill koncentráció meghatározása**

Az algatenyészetek és izolált tilakoidok klorofill koncentrációját Arnon (1949) módszerével határoztuk meg. A klorofillt a mintákból 80 % acetonnal vontuk ki. A klorofill koncentrációt az acetonos oldat 663 és 644 nm-nél, az oldószerrel szemben mért abszorpciójából számoltuk ki.

### **Az ATP mennyiségének meghatározása**

Az ATP meghatározáshoz az alga sejteket lecentrifugáltuk és 100 µg klorofill/ml koncentrációra felfuszpendáltuk. 1 ml aliquot térfogatokat 100 µl 50 % perklórsavba helyeztünk, 5 percig jégen tartottuk, majd 40 %-os KOH oldattal semlegesítettük. A denaturálódott fehérjéket és a kicsapódott  $\text{KClO}_4$ -ot centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszóból az ATP tartalmat luciferin/luciferáz rendszerben, Sigma ATP Bioluminescens Kit alkalmazásával, házi készítésű luminométerben határoztuk meg.

### **A NADPH mennyiségének meghatározása**

A redukált NADP tartalmat Heber és Santarius (1965) módszerével határoztuk meg az algasejtek alkalikus extraktumából. 100 ml algatenyészetet lecentrifugáltunk és a sejteket 0,1 M NaOH-ban szuszpendáltuk és 5 percig forró vízfürdőben tartottuk, miközben potter-homogenizátorral homogenizáltuk a mintát. Homogenizálás után jégben lehűtöttük a mintákat, és 0,1 N HCl-val a pH-t 8.0-ra állítottuk. Semlegesítés után a denaturált fehérjéket és sejtmaradványokat lecentrifugáltuk (30000 rpm, 15 min) és a felülúszóból hígítás nélkül 200 µl aliquotokat használtunk a NADPH



meghatározásához. Az alkalikus feltárás során csak a redukált piridin nukleotidok maradnak meg, az oxidáltak elbomlanak. A NADPH mennyiségét ciklikus enzimreakció segítségével határoztuk meg a következő reakció elegyben:

500  $\mu$ M dikloro-fenol-indofenol (DCPIP)

15 mM Tris-buffer (pH 8,0)

3 mM Glükóz-6-foszfát

0,5 mg/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (Sigma)

50  $\mu$ M fenazin-metoszulfát

Az enzimreakciót 0,2 ml minta hozzáadásával indítottuk. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz a glükóz-6 foszfátot oxidálja NADP<sup>+</sup> kofaktoral. A reakció NADP<sup>+</sup>-re specifikus. A reakció során a redukált nukleotid formát a fenazin-metoszulfát reciklizálja. A redukált fenazin-metoszulfát redukálja a DCPIP-t. A DCPIP redukcióját a 600 nm-en bekövetkező abszorpcióváltozás mérésével követtük nyomon, Shimadzu UV-3000 spektrofotométerben. A reakció sebessége az alkalmazott körülmények között arányos a NADPH koncentrációjával. A NADPH mennyiségét ismert koncentrációjú NADPH oldatból készített hígítási sorozat felhasználásával készült kalibrációs egyenesről olvastuk le.

#### **A tilakoid membrán fehérjék elválasztása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel**

A tilakoid membránokat 3 percig forró vízfürdőben 500 mM Tris-HCl (pH 6,8)/ 20 % glicerin/ 7 % SDS/ 10 % merkaptoetanol elegyben inkubáltuk, hogy a hidrofób fehérjék teljesen denaturálódjanak és kioldódjanak a mintákból. A tilakoid membrán fehérjéket 1 mm vastag 10-18 %-os grádiens gélen (akril-amid/bis-akril-amid 30:0,8) választottuk el 5 % stacking gél alkalmazásával. A géltre azonos mennyiségű, 10  $\mu$ g

klorofillt tartalmazó mintákat vittünk fel. Az elektroforézist 18-20 órán át, 6-8 mA áramerősséggel végeztük.

### **Az LHC II foszforilációjának vizsgálata**

Az algatenyészeteket lecentrifugáltuk és foszfát mentes tápoldattal 100 µg klorofill/ml koncentrációra szuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót 2 µCi aktivitású <sup>32</sup>P ortofoszfát jelenlétében inkubáltuk 2 órán keresztül. A jelölés után az algasejteket lecentrifugáltuk és foszfátmentes nevelőközegben 10 µg klorofill/ml koncentrációra hígítottuk. Az algát két részre osztottuk és autotróf ill. fotoheterotróf nevelőközegben neveltük tovább. Meghatározott időpontokban mintát vettünk és tilakoidot izoláltunk. A tilakoid fehérjéket SDS-PAGE módszerrel választottuk el. Festés és szárítás után a gélekről autoradiogramot készítettünk az LHC II fehérjék foszforiláltságának a meghatározására.

### **Fehérjék immunoblott analízise**

Az SDS-PAGE segítségével elválasztott fehérjéket 4 °C hőmérsékleten 4 órán keresztül 300 mA áramerősséggel kvantitatívan nitrocellulóz membránra vittük át 25 mM Tris/ 190 mM glicin (pH 8,3)/ 20 % metanol pufferben. Transzferálás után a fehérjéket a membránon 5 % formaldehiddel rögzítettük, majd a nitrocellulóz membránt 1 óráig 5 % tejport tartalmazó pufferben áztattuk. A PsbA fehérjét *Chlamydomonas reinhardtii* PsbA fehérje ellen termeltetett ellenanyaggal (Andersson B., Stockholm, Svédország), míg a PsbB és PsaA fehérjéket *P. cruentum* PsbB és PsaA fehérjéi ellen termelt ellenanyaggal (Gantt E., Washington, USA) jelöltük. A

megfelelő fehérjéhez kötődött elsődleges antitesteket torna-peroxidázzal konjugált, kecske IgG (H+L) anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal jelöltük meg. A jelölt fehérjéket H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében fényérzékeny színreakcióval tettük láthatóvá. A fehérjék mennyiségét Bio-Rad denzitométerrel határoztuk meg.

### **A *psbA* és *psaA* mRNS-ek mennyiségének meghatározása**

20 ml 10-20 µg klorofill/ml koncentrációjú algát lecentrifugáltunk, cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk, majd porrá törtük. A fagyott mintát 5 ml RNS extraháló pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8,0/ 300 mM NaCl/ 5 mM EDTA/ 2 % SDS/ 10 mM β-merkaptóetanol/ 1 mM aurin-trikarboxilsav) felfuszpendáltunk és 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Az RNS-t lítium-kloridos kicsapással és egyszeri fenolozással tisztítottuk. A végső csapadékot steril vízben oldottuk és az RNS koncentrációt 260 nm hullámhosszon spektrofotometriásan meghatároztuk. Az össz RNS preparátumokból 2-2 µg-ot, 5' végén <sup>32</sup>P-vel jelölt *Chlamydomonas reinhardtii* *psbA* ill. *psaA* génszakaszokra specifikus oligonukleotid próbával hibridizáltunk. A DNS próbák 70 nukleotid (64 homológ és 6 nem homológ) hosszúságúak voltak. A hibridizálást 45 °C hőmérsékleten egy éjszakán át végeztük 10 mM PIPES (pH 6.8)/ 0,2 mM EDTA/ 0,8 M NaCl pufferben. Hibridizálás után a mintákat 500 U/ml koncentrációjú S1 nukleázzal emésztettük 30 °C-on 60 percig 30 mM Na-acetát (pH 4.5)/ 0,5 M NaCl/ 1 mM ZnSO<sub>4</sub>/ 20 µg/ml DNS pufferben. Az S1 nukleáz reakciót 25 µl 0,1 M EDTA/ 4 M ammónium-acetát/ 400 µg/ml tRNS-t tartalmazó pufferrel állítottuk le. Az S1 nukleáz lebontja a nem hibridizált egyszálú RNS és DNS láncokat, és csak a specifikus szekvenciákkal hibridizálódott oligonukleotidok maradnak meg. Az épen maradt <sup>32</sup>P-jelölt DNS oligonukleotid próbákat 8 M urea tartalmú 0,4 mm

vastagságú 8 %-os poliakrilamid gélen választottuk el 65 W teljesítménnyel. Az elektroforézis után a géleket megszáritottuk és autoradiogramot készítettünk róla ill. az elválasztott DNS fragmentek aktivitását Phosphor Image Analyzer-rel határoztuk meg.

## **Biofizikai módszerek**

### **Az oxigénfejlődés mérése**

Az oxigénfejlődés sebességét Clark-típusú oxigén elektróddal (Hansatech, Kings Lynn, England) mértük a nevelőközegben, 10-20  $\mu\text{g}$  klorofill/ml koncentrációjú intakt alga sejteken, 25 °C-ra termosztált mintatartóban, telítési fényintenzitáson fehér fényben. A PS II aktivitását 500  $\mu\text{M}$  fenil-p-benzokinon jelenlétében mértük.

### **A fluoreszcencia indukció mérése**

A fluoreszcencia indukciót szobahőmérsékleten mértük PAM-101/102/103 típusú klorofill fluorométerrel (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). 2 ml, 10-20  $\mu\text{g}$ /ml klorofill koncentrációjú, közvetlenül a tenyésztő edényből kivett mintát pipettáztunk a mintatartóba, melyet egy optikai vezető kapcsol össze a fluorométer ED 101 emitter-detektor egységével. Az  $F_0$  értéket 3 perc sötétadaptálás után, gyenge, 1.6 kHz-cel modulált vörös fényel mértük. Az  $F_{\text{max}}$  értéket 0,4 s hosszú, erős, telítési fehér fényimpulzussal határoztuk meg. A Kautsky görbe felvételéhez, az  $F_i$  és  $F_p$  paraméterek meghatározásához a nevelőfényel azonos, 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aktinikus fényel világítottuk meg a mintát 5 s hosszan az  $F_0$  szint meghatározását követően. A



PS II<sub>B</sub> reakciócentrumok arányát a fluoreszcencia indukciós görbe feletti terület növekedésének szemilogaritmikus ábrázolásából határoztuk meg Melis és Homann (1976) alapján, FIP program segítségével.

A fluoreszcencia relaxáció mérésekhez a mintákat XST-103 fényforrásból származó, csak egyetlen elektron átmenetet kiváltó telítési fényfelvillanással világítottuk meg. A felvillanást követő fluoreszcencia relaxációt ms-os ill. másodperces időskálán vettük fel.

### **77 K-es fluoreszcencia emissziós spektrum mérése**

A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 77 K hőmérsékleten mértük egy házi építésű fluoriméterben. Az alga tenyészetekből azonos mennyiségű klorofillt tartalmazó térfogatokat rétegeztünk egy gyolcs korongra, amelyet egy dewar edény aljára helyeztünk cseppfolyós nitrogénben. A mintát egy fényvezetőn és egy Corning 4-96 szűrőn keresztül kék fényel világítottuk meg. Ugyanezen az osztott fényvezetőn és monokromátoron keresztül mértük a kibocsátott fluoreszcencia fény intenzitását egy EMI 9558B típusú fotoelektronsokszorozóval 600-750 nm hullámhosszak között. Az alga fluoreszcenciáját a mintához adott, ismert mennyiségű, Rhodamin G-6 fluoreszcens festék 575 nm-es fluoreszcencia sáv intenzitására normáltuk.

### **A termolumineszcencia mérése**

A termolumineszcencia méréseket házi építésű berendezéssel végeztük. A közvetlenül a nevelő edényből vett 10-20 µg/ml klorofill koncentrációjú, 0,3 ml térfogatú mintákat 10 W/m<sup>2</sup> erősségű fehér fényel világítottunk meg -80 °C

hőmérsékleten a mintatartóban. Megvilágítás után a mintákat sötétben 20 °C/min sebességgel melegítettük fel +80 °C hőmérsékletre és a hőmérséklet függvényében megmértük a kibocsátott termolumineszcencia fény intenzitását egy végablakos Hamamatsu R 2228 típusú fotoelektronsokszorozóval. A Q TL sáv meghatározásához a mérés előtt 10 µM DCMU-t adtunk.

### **Fényindukált citokróm *f* abszorpció változás mérés**

3 ml 10 µg/ml klorofill koncentrációnak megfelelő sejtszuspenziót egy xenon villanólámpából származó, 50 ms hosszú, Schott RG 645 szűrőn keresztül vezetett telítési fényfelvillanással gerjesztettünk egy 1 cm-es üvegtáblában. A Baush & Lomb monokromátorból származó, 554 nm hullámhosszúságú mérőfényt az aktinikus gerjesztő fényre merőlegesen vezettük a mintába, és egy végablakos, az aktinikus fénytől interferencia szűrővel védett EMI 9890B fotoelektronsokszorozóval detektáltuk. A jel/zaj arány növelésére 20, egymás után 3 s sötét várakozással következő mérést átlagoltunk.

### **Fényindukált P700 abszorpció változás mérés**

A P700 redox állapotát a 820 nm-en mérhető abszorpció változás mérésével követtük nyomon az erre a célra kifejlesztett ED-820T emitter-detektor egységgel kiegészített PAM 101 klorofill fluorométerben (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). A méréshez az algatenyészetekből 2 cm átmérőjű szűrőpapírra, azonos klorofill mennyiséget tartalmazó mintákat rétegeztünk, és azt illesztettük az emitter-detektor egység fényvezetőjének végéhez. A P700 oxidációját, ugyanazon elágazó

fényvezetőn keresztül, telítési fehér fényel idéztük elő. A mintát addig világítottuk, míg az abszorpció változás elérte a maximumát (10-20 s), majd a megvilágítást lekapcsolva ms-os időfelbontásban mértük a P700 sötét redukcióját. A P700 lineáris elektrontranszport általi redukciójának kiküszöböléséhez 10  $\mu\text{M}$  DCMU-t, a ciklikus elektrontranszport gátlásához 50  $\mu\text{M}$  metilvöröst adtunk.

### **A PS I, PS II és a citokróm $b_6/f$ komplex spektrofotometriás meghatározása**

A PS I mennyiségét a PS I klorofill  $a$  reakciócentruma, a P700 kémiaileg oxidált, majd redukált formáinak abszorpciós spektrumának különbségéből határoztuk meg. Az izolált tilakoid membrán preparátumokban a P700-at először 1 mM kálium-ferricianiddal oxidáltuk, majd szilárd natrium-aszkorbát por adagolásával redukáltuk. Az oxidált ill. redukált P700 különbségi spektrumát 680 és 750 nm között mértük meg egy kétsugaras Shimadzu UV 3000 spektrofotométerrel 1 cm-es küvettában. A referencia hullámhosszt 730 nm-re állítottuk. A P700 mennyiségét a 700 nm-en mérhető abszorpció változásból az Aizawa és mtsai. (1992) által megadott különbségi moláris extinkciós koefficiens ( $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) alapján számoltuk.

A PS II mennyiségét a citokróm  $b_{559}$ , a citokróm  $b_6/f$  komplex mennyiségét a citokróm  $f$  és  $b_6$  mennyiségéből határoztuk meg az egyes komponenseknek a komplexeken belüli sztöichiometriai arányainak figyelembe vételével. Mivel a háromféle citokróm standard középponti potenciálja különbözik egymástól, (citokróm  $b_{559}$  80 mV [Garewal és Wasserman, 1974], citokróm  $b_6$  -50 mV [Bald és mtsai., 1992], citokróm  $f$  340 mV [Bald és mtsai., 1992]), az oxidált citokrómok kémiaileg szekvenciálisan redukálhatók a tilakoid membrán szuszpenzió redox potenciáljának változtatásával. A mérésekhez 50  $\mu\text{g/ml}$  klorofill koncentrációjú tilakoid

szuszpenziókat használtunk. Mind a három citokróm esetében a spektrumokat 540 és 570 nm között vettük fel és a referencia hullámhosszat 570 nm-nek választottuk. Először az összes citokrómot oxidáltuk 1 mM kálium-ferricianiddal, majd néhány szemcse szilárd hidrokinont adtunk. Az oxidált és redukált formák különbsége 554 nm körül jelent meg, ami megfelel a legmagasabb redoxpotenciálú citokrómnak, a citokróm *f*-nek. Az alapvonal normalizálása után natrium-aszkorbát porból néhány szem kristályt szórtunk a mintába a citokróm *b*<sub>559</sub> redukációjához. A kapott differencia spektrum maximuma 559 nm körül volt. A legalacsonyabb redoxpotenciálú citokróm *b*<sub>6</sub> redukálásához kristályos natrium-ditionitot adtunk. A differencia spektrum maximuma, 563 nm, itt is igazolta, hogy a citokróm *b*<sub>6</sub> abszorpció változását láttuk. A PS II mennyiségét a citokróm *b*<sub>559</sub> mennyiségének felével vettük azonosnak. A citokróm *b*<sub>559</sub> mennyiségét a  $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Cramer és Whitmarsh, 1977) érték alapján számoltuk. A citokróm *b*<sub>6</sub>/*f* komplex mennyiségét a citokróm *f* ( $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Cramer és Whitmarsh, 1977) mennyiségével ill. a citokróm *b*<sub>6</sub> ( $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Cramer és Whitmarsh, 1977) mennyiségének felével vettük azonosnak. A citokróm *f* és citokróm *b*<sub>6</sub> alapján egymástól függetlenül számolt értékek jó egyezést mutattak.

### **A tirozin D<sup>+</sup> ESR spektroszkópiás meghatározása**

A PsbD fehérje tirozin 160<sup>+</sup> radikál ESR jelét Bruker ER 200 D-SCR spektrométerben végeztük. Mérés előtt az algasejteket centrifugálással 2 mg/ml klorofill koncentrációra töményítettük. A sejtuszuszpenzióból 300 µl-t 3 mm átmérőjű ESR csövekbe töltöttük, majd a mintatartóban -40 °C-on, 5 percig, 1000 W/m<sup>2</sup> erősségű fehér fényel gerjesztettük. Megvilágítás után a mintát 15 percig -40 °C-on

sötétadaptáltak, hogy a  $\text{tyrD}^+$  ( $g=2,0046$ ) jellel átfedő, klorofill  $a$  radikálból származó ( $g=2,0025$ ) jel lecsengjen. A  $\text{tyrD}^+$  jel amplitudója 15 perc sötét alatt nem változik. A sötétadaptálás után a spektrumokat 330-339 mT mágneses tér tartományban  $200 \mu\text{W}$  teljesítményű 9,42 GHz frekvenciájú mikrohullámú gerjesztés mellett mértük meg.

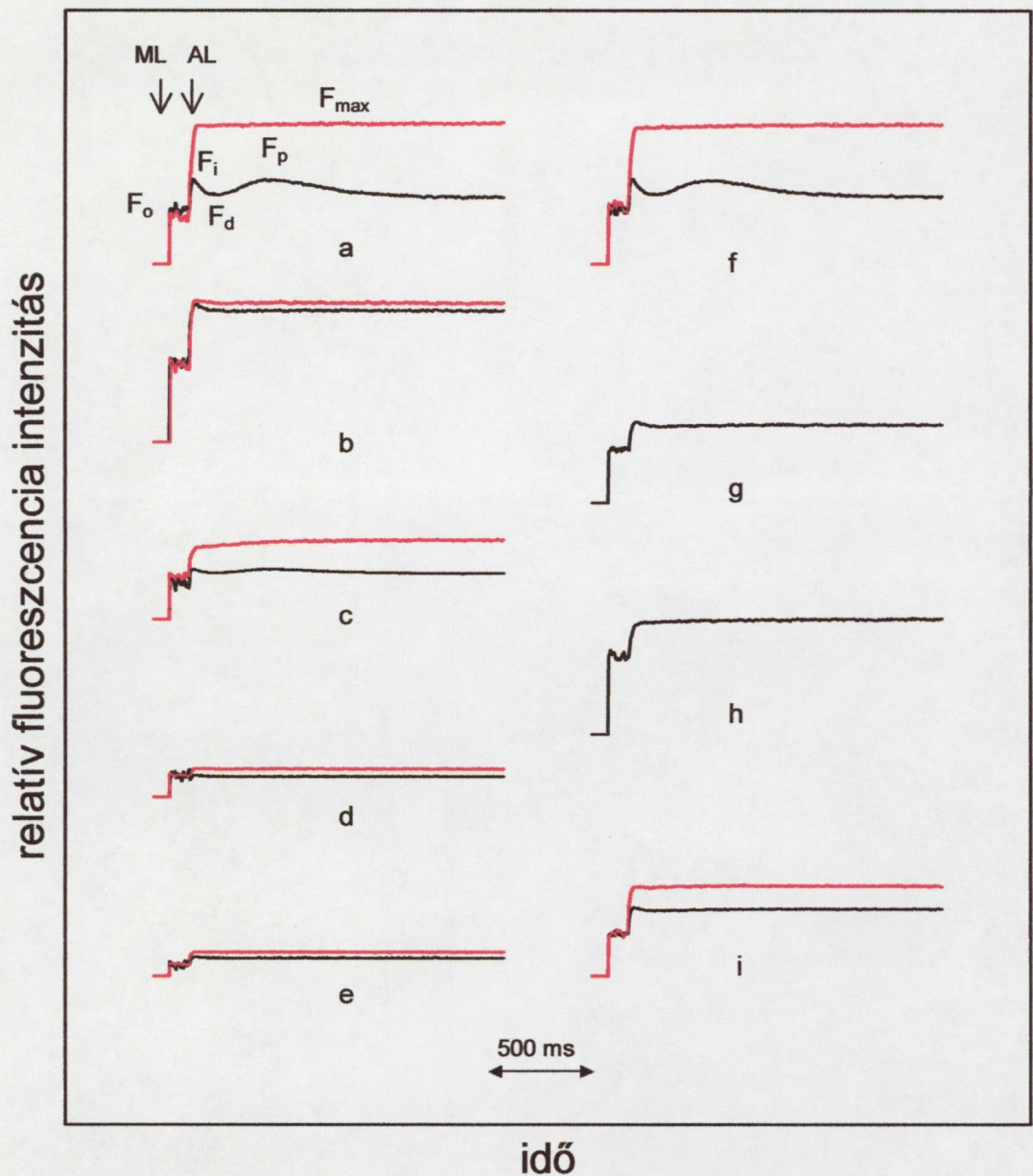


## Eredmények és megvitatásuk

### Az acetát metabolizmus hatása a fotoszintetikus elektrontranszportra

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc állapotában bekövetkező változások nyomonkövetésére az egyik legalkalmasabb módszer a fluoreszcencia indukció mérése, ezért megvizsgáltuk a fluoreszcencia indukció paramétereinek változását az autotróf életmódról mind ftoheterotróf (+acetát,  $-\text{CO}_2$ ), mind fotomixotróf (+acetát,  $+\text{CO}_2$ ) életmódra való áttérés során *Chlamydomonas stellata* algában (6. ábra). A szobahőmérsékleten mért fluoreszcencia intenzitás időbeli változásai a PS II elsődleges akceptorának, a  $Q_A$ -nak a redox állapotát ill. annak változásait, valamint, a PS II elektrontranszportját szabályozó folyamatokat tükrözi.

Az autotróf módon nevelt algában a fluoreszcencia intenzitása, az aktinikus fényvel történő megvilágítás után, a kezdeti  $F_0$  szintről gyorsan az  $F_i$  szintre emelkedik a  $Q_A$  redukciója következtében. Az elsődleges ( $Q_A$ ) és másodlagos ( $Q_B$ ) kinon akceptorok közötti elektrontranszport a fluoreszcencia intenzitás átmeneti csökkenését okozza, majd a PQ pool redukciója a fluoreszcenciát az  $F_p$  szintre emeli. DCMU hatására, amely a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport gátlásával megakadályozza a  $Q_A$   $Q_B$  általi reoxidációját és így a  $Q_A$  teljes mértékben redukálódik, a fluoreszcencia intenzitás az  $F_0$  szintről gyorsan a maximumra ( $F_m$ ) emelkedik. Az autotróf nevelésről ftoheterotróf nevelésre való áttérés, a DCMU-hoz hasonló változásokat idéz elő a fluoreszcencia indukcióban. 20 perccel a ftoheterotróf körülmények közé helyezés után a fluoreszcencia  $F_i$  paramétere a DCMU jelenlétében mérhető  $F_m$  szintjére emelkedik. Hosszabb időtartamban vizsgálva az acetát metabolizmus hatását, további változásokat figyelhetünk meg a



6. ábra. Különböző körülmények között nevelt *Chlamydomobtrys stellata* fluoreszcencia indukciós görbéi. (a) autotróf nevelés; (b, c, d) 30 perces, 2 órás, 12 órás heterotróf nevelés; (e) 12 órás mixotróf nevelés; (f) 30 perc heterotróf nevelés 1 mM mono-fluoro-ecetsav (MFA) jelenlétében; (g) 12 órás heterotróf nevelés 10  $\mu$ M DCMU jelenlétében; (h) 12 órás heterotróf nevelés 5  $\mu$ M DBMIB jelenlétében; (i) 2 óra autotróf nevelés 40 mM piroszőlősav jelenlétében (—) DCMU nélküli mérés; (—) 10  $\mu$ M DCMU közvetlenül a mérés előtt ML- mérőfény, AL- aktinikus fény

fluoreszcencia indukcióban. Az acetát adását követően kb. 2 órával a maximális fluoreszcencia hirtelen lecsökken, amit az  $F_m$  további, de lassabb csökkenése követ.

12 óra ftoheterotróf nevelés után az  $F_m$  és  $F_0$  szint rendkívül alacsony szintre

csökken és az  $F_m$  és  $F_o$  különbsége, az un. változó fluoreszcencia, gyakorlatilag eltűnik.

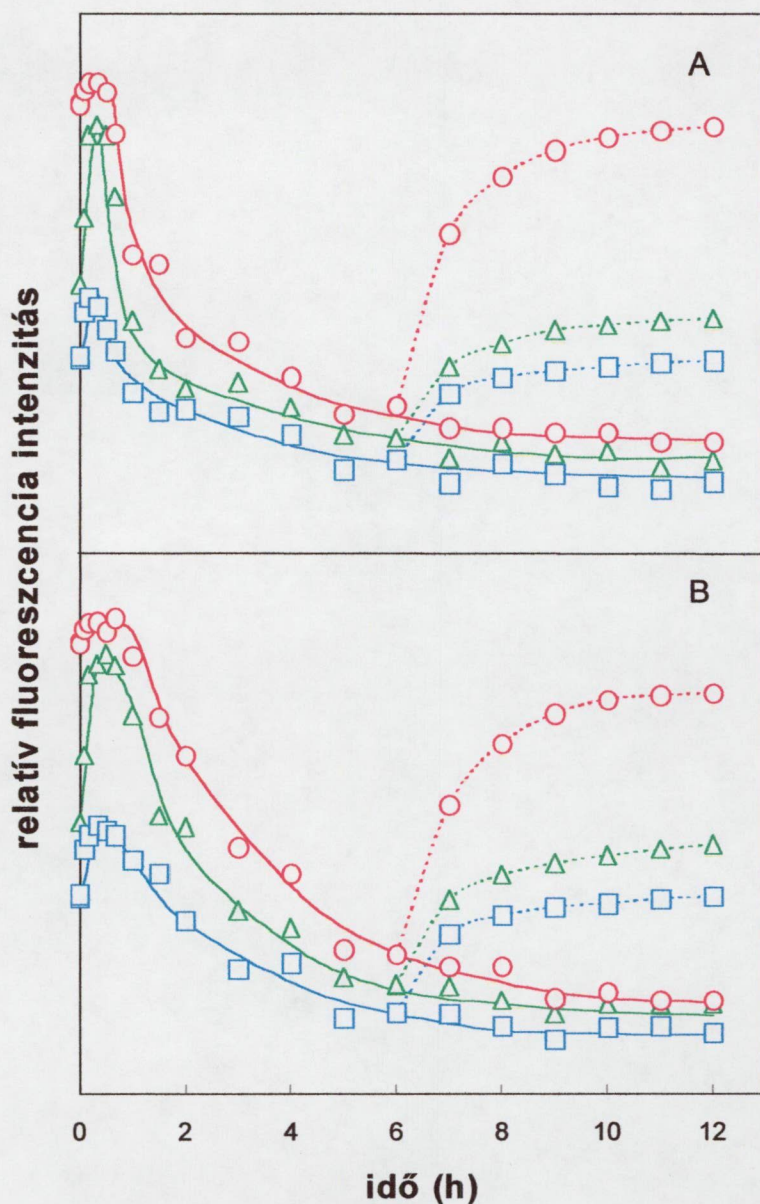
A mixotróf körülmények között megfigyelt fluoreszcencia indukció változások nagyon hasonlóak a heterotróf körülmények között kapottakhoz, ami azt mutatja, hogy a  $CO_2$  jelenléte nem befolyásolja lényegesen az acetát metabolizmus által kiváltott hatásokat.

Ismert, hogy az acetát nagyobb koncentrációban gátolja a PS II vízbontását (Saygin és mtsai., 1986), ezért az autotróf-fotoheterotróf átmenet hatását megvizsgáltuk mono-fluoro-ecetsav (MFA) jelenlétében is, amely a glioxilsav-ciklus egyik kulcs enzimét, az akonitáz enzimet gátolja. MFA hatására nem figyelhetők meg az acetát fluoreszcencia indukcióra gyakorolt hatásai (6. ábra), igazolva, hogy az acetát a sejtben indukált metabolikus folyamatokon keresztül fejt ki a hatását, és nem az elektrontranszportra gyakorolt közvetlen gátló hatásai lépnek fel. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az acetát hatások csak intakt sejteken figyelhetők meg, izolált, az acetát fotoasszimilációjára önmagában képtelen kloroplasztiszra ill. tilakoid membránokra, az általunk alkalmazott koncentrációban (20 mM), az acetátnak semmiféle hatása nincs.

A fluoreszcencia indukció paraméterek változásainak időfüggését mutatja a 7. ábra fotoheterotróf ill. fotomixotróf körülmények között. Az  $F_i$  emelkedése az első fél órában azt jelenti, hogy az acetát metabolizmus hatására a PS II akceptor oldala nagy mértékben redukálódik. Ezt a redukciót igazolja az  $F_o$  kismértékű növekedése is, mivel  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti egyensúlyi viszonyok lehetővé teszik, hogy a plasztokinon nagymértékű redukciója a  $Q_A$  kismértékű redukcióját okozza (Diner, 1977), ami a zárt reakciócentrumok számának a növelésével az  $F_o$  látszólagos növekedését eredményezi. Az  $F_i$  szint a fotoheterotróf nevelés alatt mindvégig az  $F_m$  közelében

marad, bizonyítva, hogy a ftoheterotróf algában a PS II akceptor oldala sokkal redukáltabb állapotban van, mint az autotróf algában. Az  $F_i$  átmeneti növekedését 1-2 órán belül az  $F_i$  és  $F_m$  egyidejű és csaknem párhuzamos csökkenése követi. Ez a csökkenés nigericin jelenlétében is megfigyelhető. A nigericin megakadályozza, hogy a tilakoid membrán két oldala között a megvilágítás hatására pH grádiens alakuljon ki, így az  $F_m$  csökkenése nem magyarázható a membrán energizációja következtében kialakuló  $q_E$  típusú nem-fotokémiai kioltással. A maximális fluoreszcencia csökkenése jellemző kísérő jelensége egy másik típusú nem-fotokémiai kioltásnak, a state 1/state 2 átmenetnek, amely a pH grádiensről függetlenül is lejátszódik. A state átmenetek kiváltásában az elektrontranszport redox állapota a meghatározó (Murakami és Fujita, 1993; Allen, 1995). Az acetát metabolizmus által kiváltott fluoreszcencia kioltást a  $\Delta pH$  függetlensége ill. a redukív körülmények kialakulásával való egybeesése alapján state 1/state 2 átmenetként azonosítottuk. Ezen feltételezés alapján az autotróf algában megfigyelhető magas fluoreszcencia hatásfokú állapot megfelel a PS I fényben kialakuló state 1 állapotnak, míg az acetát adással együttjáró redukción követően kialakuló alacsony fluoreszcenciájú állapot a PS II fényben megfigyelhető state 2 állapotnak felel meg. A state 1/state 2 átmenet csökkenti a PS II abszorpciós hatáskeresztmetszetét, csökkentve a PS II által katalizált elektron transzportot, és ezáltal lehetővé teszi a két fotokémiai rendszer közötti elektron transzport komponensek részleges reoxidációját. Ez lehet a magyarázata a DCMU jelenlétében és DCMU nélkül mért fluoreszcencia indukciós görbék ill. az  $F_m$  és  $F_i$  paramétereknek a fluoreszcencia hatásfok csökkenése alatti kis mértékű szétválásának (6. és 7. ábra), valamint a kis mértékben megemelkedett  $F_0$  eredeti értékre való visszatérésének. Az  $F_m$  és  $F_i$  további 6-12 óra alatt bekövetkező lassú csökkenését az  $F_0$  párhuzamos csökkenése kíséri és az  $F_0$  jóval az autotróf állapotnak





7. ábra. *Chlamydomobtrys stellata* fluoreszcencia indukció paramétereinek időbeli változása fotomixotróf (A) és fotheterotróf (B) nevelés alatt. —○—,  $F_{\max}$ ; —△—,  $F_i$ ; —□—,  $F_o$ ; szagatott vonal: 6 óra mixotróf ill. heterotróf nevelés után autotróf körülmények közé visszahelyezett algaltenyészetek. Az ábra egy-egy tipikus mérési eredményt mutat

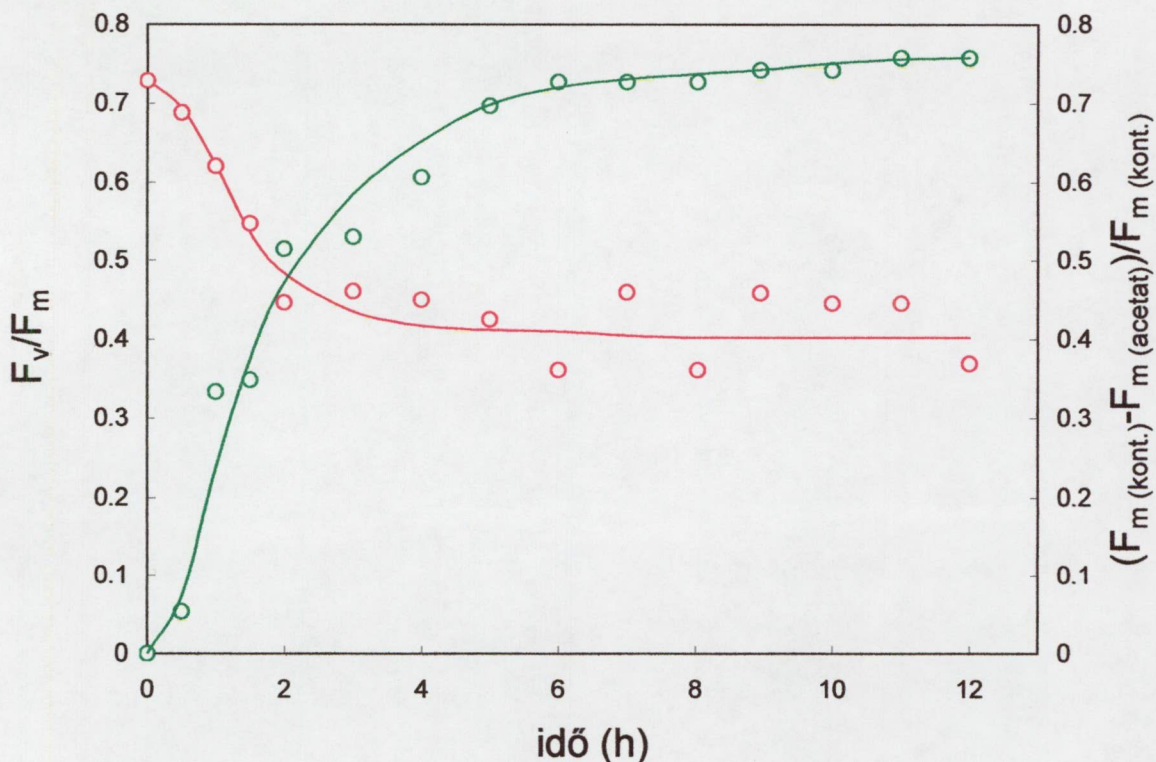
megfelelő érték alá csökken. A fluoreszcencia paraméterek ilyen nagy arányú csökkenése már nem magyarázható csak state 1/state 2 átmenettel. A csökkenés második, lassú fázisa a PS II fehérjekomplex mennyiségének csökkenéséből eredhet, de nem zárható ki egy azonosítatlan fluoreszcencia kioltó folyamat hatása sem.



A ftoheterotóf vagy fotomixotróf alga visszahelyezése autotróf körülmények közé visszaállítja az eredeti  $F_m$ ,  $F_i$  és  $F_o$  értékeket. Autotróf körülmények között az elektrontranszportlánc redukáltsága csökken, gyors state 2/state 1 átmenet történik. Az alga lecentrifugálását és friss, acetát mentes nevelő közegben történő felszuszpendálását követően már 10-20 perc múlva az  $F_m$  jelentősen megnő, a teljes mértékű visszaállítás azonban csak hosszabb, több óráig tartó folyamat eredménye képpen történik meg. Valószínűleg ez idő alatt megy végbe a PS II komplex újraszintézise.

A PS II maximális fotokémiai hatásfokának jellemzésére az  $F_v/F_m$  az egyik leggyakrabban használt paraméter. Az  $F_v$  meghatározását ugyan bizonytalanná teszi az acetát metabolizmus okozta redukció, ill. az ez által okozott látszólagos  $F_o$  növekedés, ez azonban csak kis mértékben torzítja az  $F_v/F_m$  meghatározást, mivel az  $F_v$  csökkenésében az  $F_m$  változása a meghatározó (7. ábra). Az  $F_v/F_m$  az acetát adása után 2 órán belül kb. 60 %-ra csökken a nem-fotokémiai kioltásoknak köszönhetően (8. ábra). Az acetát okozta fluoreszcencia kioltás mértékét az autotróf kontrol algában mérhető maximális fluoreszcenciára vonatkoztatott  $\Delta F_m$  változással, az  $(F_{m(kont.)} - F_{m(acetát)})/F_{m(kont.)}$  értékkel jellemeztük. A fluoreszcencia paramétereinek ( $F_m$ ,  $F_i$ ,  $F_o$ ) lassú változásait már nem kíséri a PS II maximális fotokémiai hatásfokának ( $F_v/F_m$ ) csökkenése. Ez szintén alátámasztja azt a feltételezést, hogy a hosszú távon megfigyelhető változások a PS II mennyiségi változásaival állnak kapcsolatban, mivel a PS II koncentrációjának megváltozása nem befolyásolja a fluoreszcencia hatásfokát, az csak a fluoreszcencia paraméterek abszolút értékeire van hatással.

A fluoreszcencia indukció a  $Q_A$  redox állapotát tükrözi, míg a fluoreszcencia hatásfok lecsengése, a  $Q_A^-$ , egyetlen telítési fényfelvillanást követő,  $Q_B$  általi reoxidációja, a PQ redoxállapotát jellemzi. A  $Q_A^-$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport az

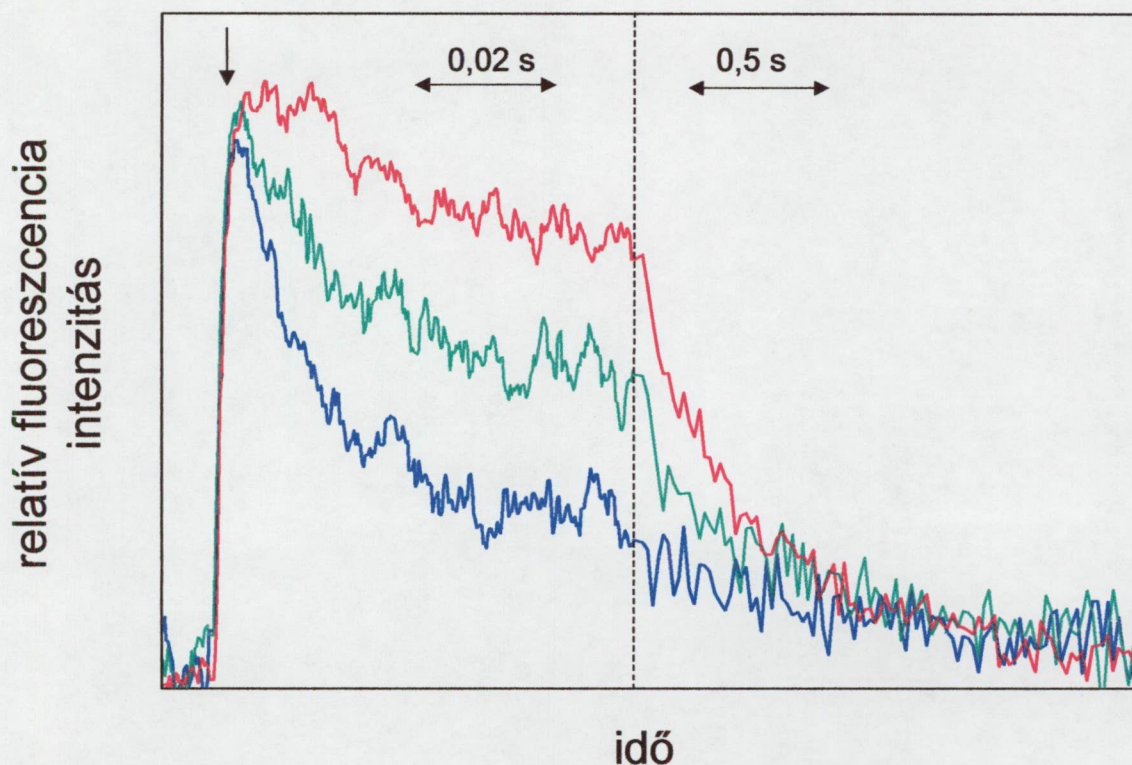


8. ábra A PS II maximális fotokémiai hatások,  $F_v/F_m$  (—○—), időbeli változása és az acetát fluoreszcencia kioltó hatása  $(F_m(\text{kont.}) - F_m(\text{acetat})) / F_m(\text{kont.})$  (—○—) az autotróf-fotoheterotróf átmenet során *Chlamydomobryx stellata* algában. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredménye szerepel.

oxidált PQ koncentrációjával másodrendű kinetika szerint változik (Crofts és Wraight, 1983), így a fluoreszcencia relaxáció sebességének mérésével a PQ redukáltsági fokáról nyerhetünk információt (9. ábra). Acetát adása előtt a telítési fényfelvillanás által indukált fluoreszcencia relaxációja gyors, jelezve, hogy elegendő oxidált PQ molekula van jelen a  $Q_A^-$  reoxidációjához. 30 perccel 20 mM acetát adása után, a  $Q_A^-$  oxidációja lényegesen lassúbbá válik, ami a redukált PQ mennyiségének növekedésével magyarázható.

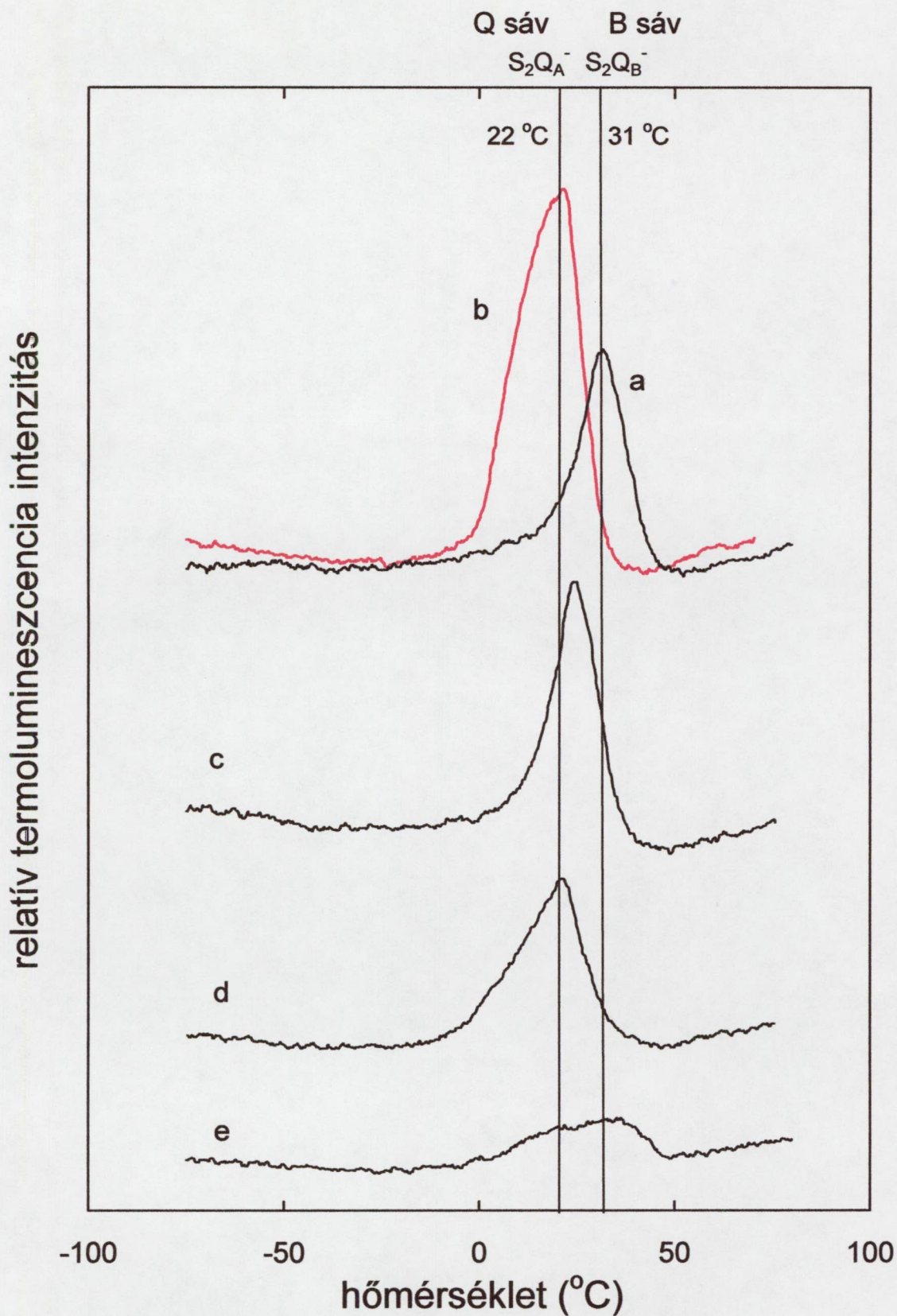
A PS II akceptor oldalának acetát hatására kialakuló redukált állapotát termolumineszcencia méréseink is bizonyítják (10. ábra). A kontrollnak tekintett autotróf algasejtekben  $-80^\circ\text{C}$ -on történő megvilágítás hatására a PS II vízbontó





9. ábra. Az acetát és DCMU hatása *Chlamydomobrya stellata* fluoreszcencia relaxációs kinetikájára. (—), autotróf; (—), 30 min fotoheterotróf; (—), autotróf alga mérés előtt 10  $\mu$ M DCMU-val kezelve ↓ telítési fényfelvillanás

rendszeréből egy elektron jut a másodlagos kinon akceptorhoz, a  $Q_B$ -hez. Melegítés hatására a  $Q_B$  molekulán tárolt elektron és a vízbontó komplex  $S_2$  állapotában tárolt pozitív töltések egy része rekombinációban vesz részt, amit fénykibocsátás kísér. Az  $S_2Q_B^-$  rekombinációból származó TL sáv maximuma 30 °C körül van. DCMU hatására az elsődleges és másodlagos kinon akceptorok közötti elektrontranszport gátolt, és az  $S_1$ - $S_2$  átmenetből származó elektron csak az elsődleges kinon akceptorig ( $Q_A$ ) jut el. Az  $S_2Q_A^-$  rekombinációból származó TL sáv, a Q-sáv maximuma alacsonyabb hőmérsékleten 22 °C körül jelenik meg. Acetát adására a PQ és ezzel együtt a  $Q_B$  molekulák redukálódnak, és csak az oxidált  $Q_A$  molekulák képesek a vízbontásból származó elektronokat fogadni, így a DCMU-val gátolt sejtekhez hasonlóan, itt is a Q TL sáv jelenik meg, megerősítve a fluoreszcencia technikákkal



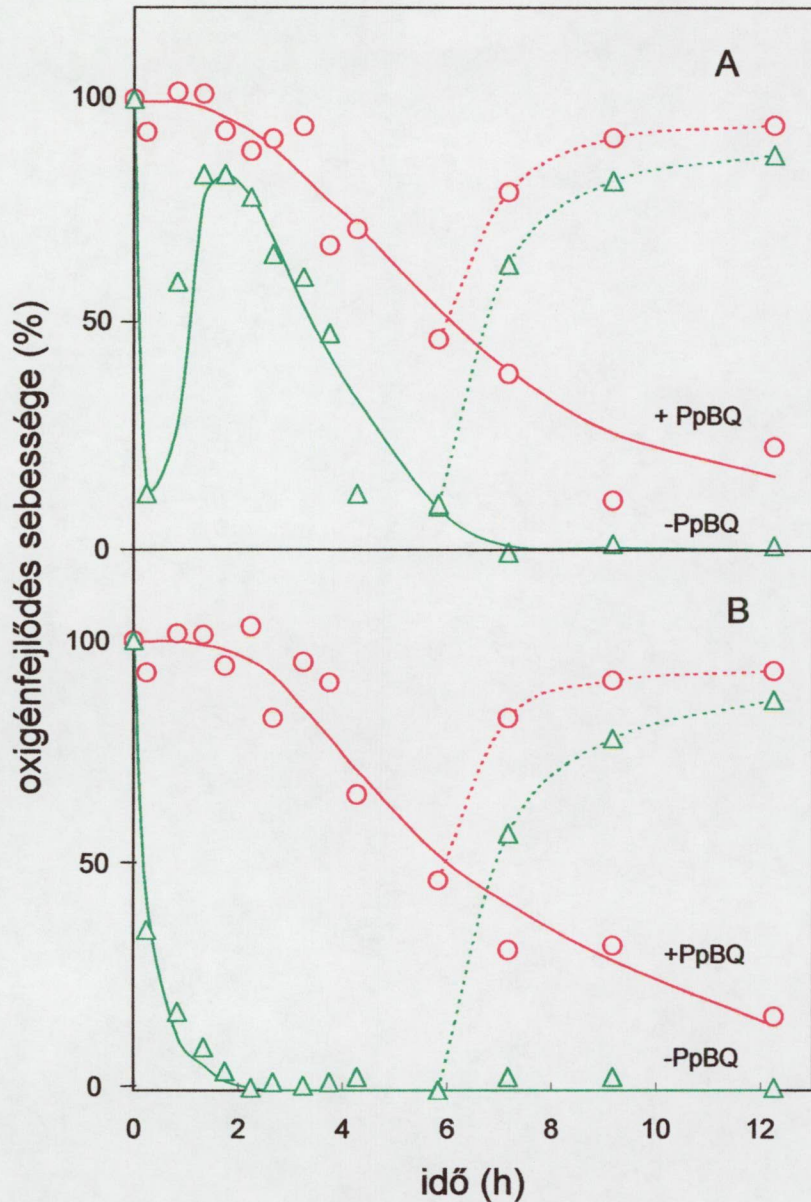
10. ábra. Fotoheterotróf nevelés hatása *Chlamydomonas stellata* algasejtek termolumineszcenciájára. (a) autotróf alga (b) autotróf alga 10  $\mu$ M DCMU jelenlétében mérve (c, d, e) 20 perc, 2 óra, 12 óra fotoheterotróf nevelés



kapott eredményeinket. Hosszabb ideig tartó fotoheterotróf ill. fotomixotróf nevelés hatására a Q-sáv amplitudója csökkenni kezd, majd 12 óra múlva csaknem eltűnik. A Q-sáv amplitudójának drasztikus csökkenése az  $S_2$  állapotok megszűnésével magyarázható, ami valószínűleg az  $S_2$  állapotok kialakulásáért felelős PS II komplex lebomlásának a következménye (10. ábra)

A PS II donor oldali funkcióinak gátlását mutatja az oxigénfejlesztő képesség megszűnése is a fotoheterotróf ill. fotomixotróf nevelés során (11. ábra). Az alga sejtekben a mixotróf körülmények közé helyezés után a fotoszintetikus oxigénfejlesztő képesség azonnal meredeken csökkenni kezd és kb. 20 perc múlva csaknem megszűnik. A gyors kezdeti esést egy átmeneti visszaállás követi, és az oxigénfejlődés sebessége megközelíti az autotróf kontroll értékét. Az átmeneti visszaállás után a fotoszintetikus aktivitás újra, az előzőhöz képest sokkal lassúbb ütemben lecsökken és alacsony értéken marad mindaddig, míg a mixotróf körülmények fennállnak. A kezdeti gyors csökkenés az elektrontranszportlánc két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő komponenseinek redukciójából adódik, amely megakadályozza a víztől a  $NADP^+$ -ig tartó lineáris elektrontranszportot. A kezdeti csökkenés nem figyelhető meg, ha az oxigénfejlődés sebességét a PS II egy mesterséges elektron akceptora, a fenil-p-benzokinon (PpBQ) jelenlétében végezzük. A PpBQ közvetlenül képes elektronokat átvenni a PS II-től, így a vízbontás zavartalanul folyhat, megerősítve a termolumineszcencia mérésekkel nyert eredményeinket, miszerint a kezdeti fotoszintetikus aktivitás csökkenésének idején az  $S_2$  állapotok még kialakulnak, a vízbontó komplex még intakt. Az oxigénfejlesztő képesség mérésével párhuzamosan végzett fluoreszcencia mérésekből kiderül, hogy ugyanezen idő alatt a maximális fluoreszcencia értéke sem változik. Az oxigénfejlesztő képesség átmeneti visszaállása viszont éppen egybeesik az  $F_m$  és az  $F_i$





11. ábra. *Chlamydomonas stellata* alga sejtek fotoszintetikus aktivitásának időbeli változása fotomixotróf (A) és fotoheterotróf (B) nevelés alatt.  $\Delta$ -, akceptor nélkül;  $\circ$ -, 500  $\mu\text{M}$  PpBQ jelenlétében mérve, szaggatott vonal: 6 óra mixotróf ill. heterotróf nevelés után autotróf körülmények közé visszahelyezett algatenyészetek A kiindulási fotoautotróf minták abszolút fotoszintetikus aktivitása: akceptor nélkül, 140; 250  $\mu\text{M}$  PpBQ-nal, 180  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2/\text{mg}$  klorofil/h. Az ábrán egy-egy reprezentatív mérés szerepel.

csökkenésével, ill. a két paraméter közötti különbség átmeneti növekedésével (7. és 11. ábra). Az autotróf-fotoheterotróf átmenet alatt az oxigén fejlesztő képességben megfigyelt változások összhangban vannak a fluoreszcencia indukció paramétereinek változásaira magyarázatként adott state 1/state 2 átmenettel. Az acetát metabolizmus

által előidézett redukció, amely gátolja a lineáris elektrontranszportot, state 1/state 2 átmenetet idéz elő. A state 1/state 2 átmenet a PS II abszorpciós hatáskeresztmetszetét és ezáltal fénybegyűjtő képességét csökkenti, ami a méréseinkben fluoreszcencia kioltásként jelentkezik. A PS II csökkent fényelnyelő képessége miatt, csökken a PS II felőli redukciós nyomás, a PS I és PS II közötti elektrontranszport komponensek részlegesen reoxidálódnak és az oxigénfejlődés újra megjelenik. A state 1/state 2 átmenet ellenére a PQ ill. citkróm *b<sub>6</sub>f* komplex még mindig jelentősen redukált marad, amit az  $F_i$  magas értéke mutat (7. ábra).

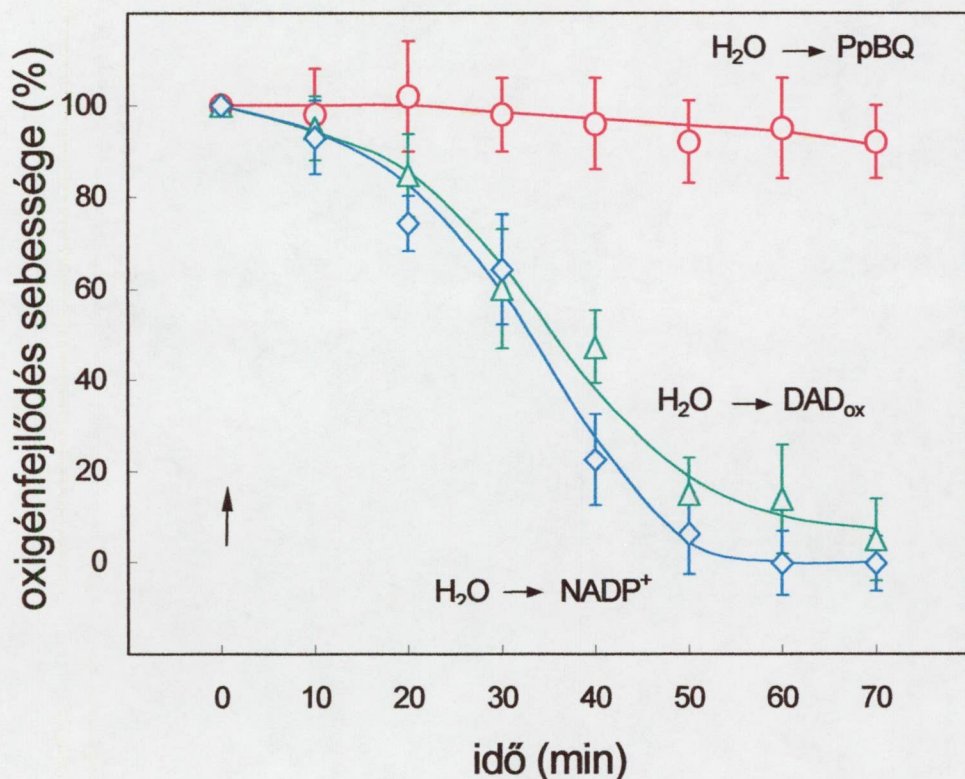
Az oxigénfejlődés csökkenésének lassú, az átmeneti visszaállást követő fázisában a PpBQ jelenlétében mérhető oxigénfejlesztő képesség is csökken, tehát ez a gátlás már nem csak a PS II akceptor oldalának túlzott redukciója miatt, hanem a vízbontó képesség elvesztése (valószínűleg a teljes PS II komplex mennyiségének csökkenése) következtében alakul ki. A fluoreszcencia és a fotoszintetikus aktivitás (a Q TL-sáv amplitudója és az oxigénfejlődés sebessége) párhuzamos csökkenése a hosszabb időtartományban inkább a szobahőmérsékletű fluoreszcencia és a vízbontásért felelős teljes PS II komplex mennyiségi változásait valószínűsíti, mintsem egy ismeretlen fluoreszcencia kioltó mechanizmus hatását.

Fotoheterotróf körülmények között az oxigénfejlődés 5-10 perc alatt megszűnik és a mixotróf nevelési körülményekkel szemben nem tapasztalható átmeneti visszaállás. A PpBQ jelenlétében mérve viszont a fotoszintetikus aktivitás időbeli változása megegyezik az autotróf-mixotróf átmenetnél tapasztaltakkal: a kezdeti gyors csökkenés elmarad és csak a lassú, órákig tartó második fázis látható. A heterotróf és mixotróf kultúrákon mért eredmények közötti eltérést az irodalomból (Govindjee, 1992) bikarbonát-hatás néven ismert jelenség alapján érthetjük meg. A PS II reakciócentrumában az elsődleges és másodlagos kinon akceptorok között

elhelyezkedő vas atom, amely önmaga nem tagja a fotoszintetikus elektrontranszportláncnak, egy  $\text{HCO}_3^-$  aniont köt meg koordinatív kötéssel. A  $\text{HCO}_3^-$  vas atomhoz kötődése szükséges a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszporthoz. A  $\text{HCO}_3^-$  eltávolítható a kötőhelyéről egyértékű anionokkal, ami *in vitro* kísérletekben a steady-state elektrontranszport leállításával jár. Az azonban még nem teljesen tisztázott, hogy a gátlás a  $\text{HCO}_3^-$  leválásának a következménye, vagy a gátló hatás kialakulásához az egyértékű anionnak a bikarbonát anion helyére történő bekötődése is szükséges. A heterotróf alga nevelő közege a mixotróféval ellentétben nem tartalmaz  $\text{CO}_2$ -ot. A  $\text{CO}_2$  és így az oldatban vele egyensúlyt tartó  $\text{HCO}_3^-$  eltávolítása a nevelő közegből a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport ill. az oxigénfejlődés sebességének lassulását eredményezi, ezért még a state 1/state 2 átmenet miatt bekövetkező részleges oxidáció sem tudja a lineáris elektrontranszportot helyreállítani. A  $\text{HCO}_3^-$  hiánya azonban nem befolyásolja a víztől a PpBQ-ig mért elektrontranszportot, így az akceptor jelenlétében mért görbék lefutása a mixotróf és heterotróf tenyészetekben azonos. A  $\text{CO}_2$  hiánynak, az acetáttól független hatásait  $\text{CO}_2$  mentes levegővel buborékoltatott algatenyészeteken tanulmányoztuk (12. ábra). A  $\text{CO}_2$  kivonása a víztől a  $\text{NADP}^+$ -ig tartó teljes elektrontranszportláncot gátolja, míg a PpBQ-ig tartó elektrontranszport  $\text{CO}_2$  hiányában is zavartalanul folyhat. Egy másik mesterséges akceptor, a diaminduren (DAD) azonban nem képes helyreállítani az oxigén fejlődést. A DAD a  $\text{PQH}_2$ -től képes elektronokat átvenni, azonban a  $Q_A \rightarrow Q_B$  elektrontranszfer gátlása miatt a PQ nem redukálódik, így a DAD is hatástalan marad. A PpBQ és DAD hatásai közötti különbség bizonyítja, hogy a  $\text{CO}_2$  hiány okozta gátlás az elsődleges és másodlagos kinon akceptor között alakul ki, és nem a Calvin-ciklus leállása következtében jön létre. Továbbá, a bikarbonát-hatás kialakulásához egyértékű anionra nincs szükség,  $\text{CO}_2$  hiányában, acetát nélkül is fellép. Garab és mtsai. (1988) spenót leveleken

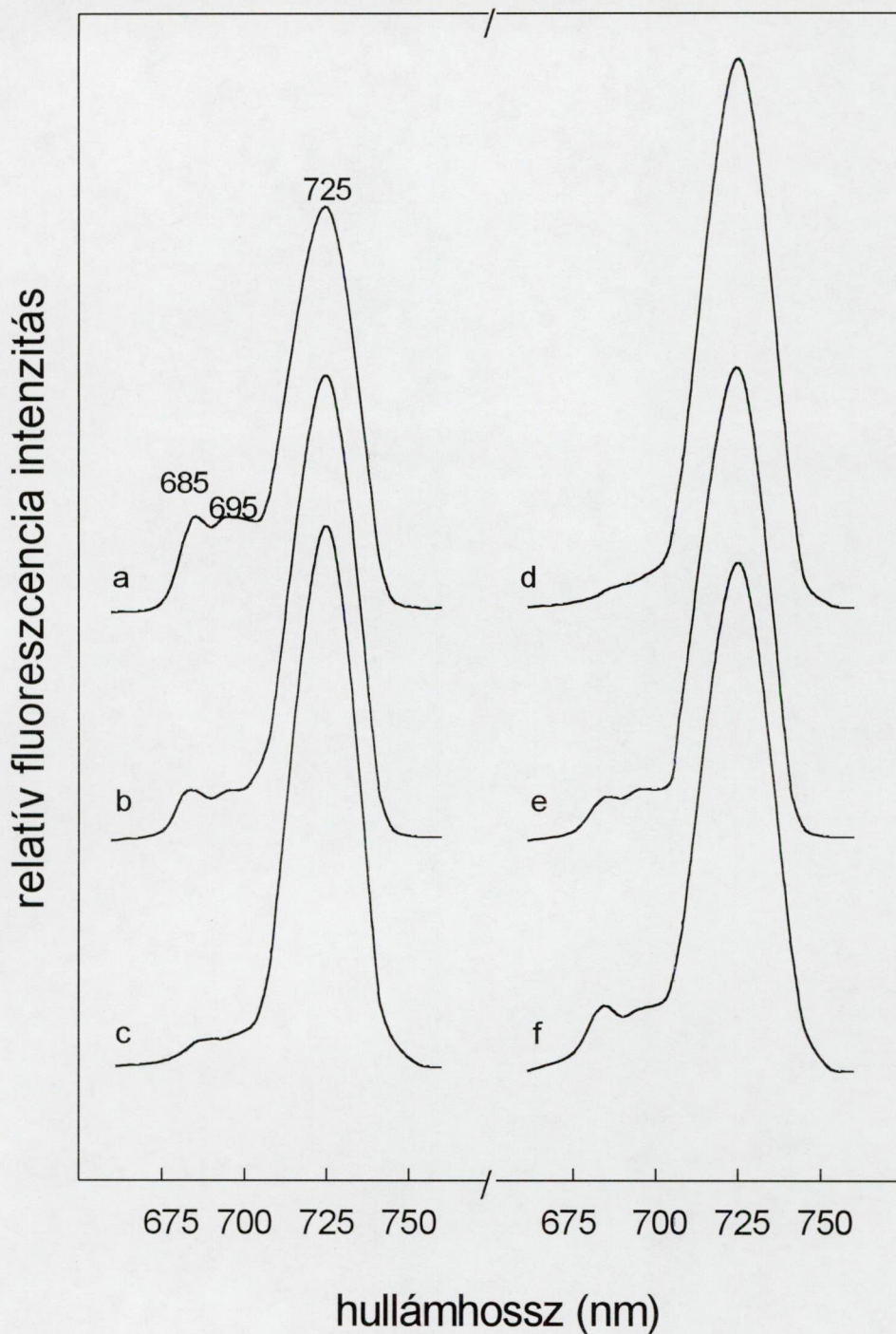


mutatták ki, hogy a CO<sub>2</sub> hiánya gátló ionok jelenléte nélkül is lassítja a redukált Q<sub>A</sub>-tól a PS I felé irányuló elektrontranszportot.



12. ábra. CO<sub>2</sub> kivonás hatása *Chlamydomobryns stellata* fotoszintetikus aktivitására. elektron transzport a víztől NADP<sup>+</sup>-ig (◊); PpBQ-ig (250 μM) (◦); oxidált DAD-ig (200 μM) (Δ) ↑, CO<sub>2</sub> kivonás kezdete. Minden mérési pont 3 mérés átlaga a CO<sub>2</sub> kivonás előtti kontroll minta százalékában kifejezve. A kontroll minták abszolút fotoszintetikus aktivitásai: H<sub>2</sub>O→NADP<sup>+</sup>, 130; H<sub>2</sub>O→DAD, 110; H<sub>2</sub>O→PpBQ, 160 μM O<sub>2</sub>/mg klorofill/h

A termolumineszcencia és szobahőmérsékletű fluoreszcencia technikák nem adnak információt az első fotokémiai rendszerről, ezért alacsony, 77 K hőmérsékletű fluoreszcencia emissziós spektrumokat is mértünk az autotróf-fotoheterotróf ill. autotróf-mixotróf átmenetek során (13. ábra). A 77 K-en mért fluoreszcencia emissziós spektrumokban megjelenik egy, a PS I-hez rendelhető sáv, melynek maximuma *Chlamydomobryns stellataban* 725 nm-nél található. A 685 és 695 nm

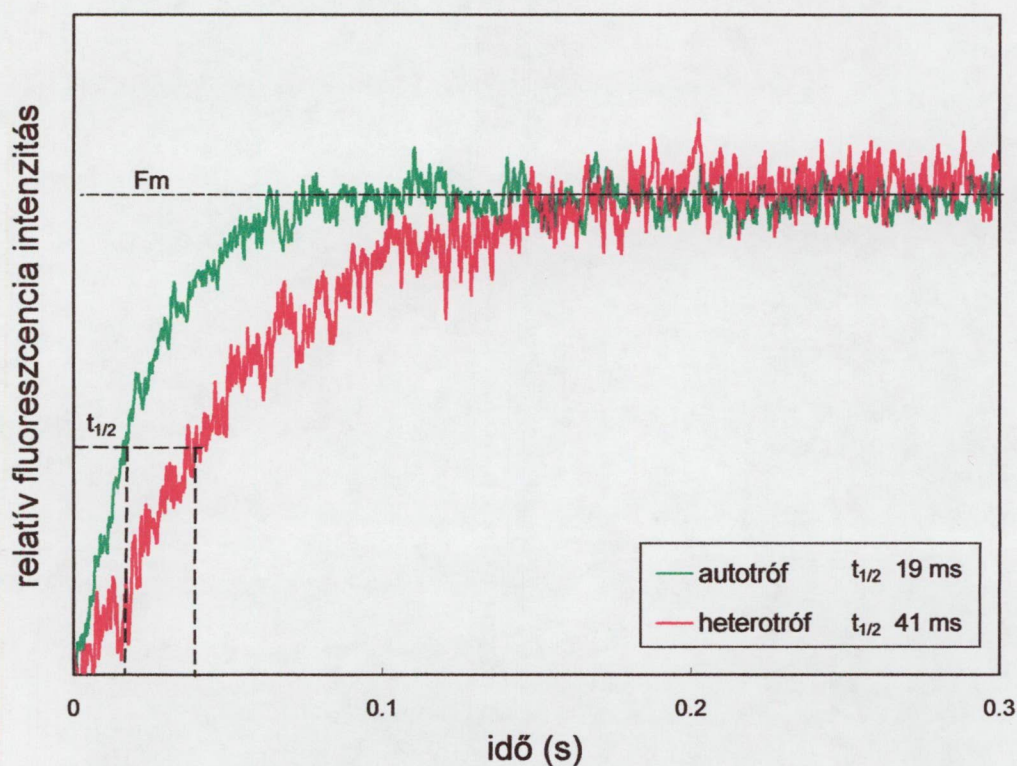


13. ábra. Különböző nevelési körülmények között nevelt *Chlamydomobryts stellata* 77 K-en mért fluoreszcencia emisszió spektrumai. (a) autotróf alga; (b, c) 2, 12 óra fotoheterotróf nevelés; (d) 12 óra fotomixotróf nevelés; (e) 12 óra fotoheterotróf nevelés 10  $\mu\text{M}$  DCMU jelenlétében; (f) 12 óra fotoheterotróf nevelés 5  $\mu\text{M}$  DBMIB jelenlétében. A DBMIB instabilitása miatt 3 óránként további 3  $\mu\text{M}$  DBMIB-t adtunk és a DBMIB hatását fluoreszcencia indukció méréssel ellenőriztük.



csúcshelyzetű sávok a PS II-höz tartoznak. A fluoreszcencia emissziós sávok intenzitását a pigment-protein komplexek szerkezete és mennyisége határozza meg, így a state átmenetek közvetlenebb bizonyítékát adják. Egy órával 20 mM acetát adása után a 77 K-es fluoreszcencia emissziós PS II sávok hirtelen lecsökkennek, és a PS I sáv kis mértékben megnő, igazolva a state 1/state 2 átmenetet, hasonlóan a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában Bulté és mtsai. (1990) által leírt, anaerób körülményekkel ill. a mitokondriális oxidatív foszforiláció gátlásával indukált state 1/state 2 átmenetet kísérő, fluoreszcencia emissziós spektrumok változásaihoz. Murakami (1997) kimutatta, hogy a hosszú időn át különböző fényviszonyok mellett nevelt *Synechocystisben* és *Chlamydomonasban* kialakuló eltérő PS I/PS II mennyiségi arány szoros korrelációt mutat a 77 K-es fluoreszcencia PS I és PS II emissziós sávjainak arányával. Mérés előtt rövid idejű sötétadaptációval a mintákat azonos, state 2, állapotba hozták a state átmenetek hatásának kiküszöbölésére. *Chlamydomonas* *stellata* algában 12 óra mixotróf ill. fotoheterotróf nevelés után a PS II sávok csaknem teljesen eltűnnek, míg a PS I sáv kb. 1,4-szeres növekedést mutat. A szobahőmérsékletű fluoreszcencia indukcióval nyert adatok alapján tudjuk, hogy a state 2 állapot már az első 1-2 óra után állandósul, így a 77 K-es fluoreszcencia emisszió hosszú idejű változásai már csak a PS II ill. a PS I komplexek mennyiségi változásait tükrözik.

A fluoreszcencia intenzitás időbeli változása az elsődleges kinon akceptor, a  $Q_A$  redukciójának sebességét tükrözi. A fluoreszcencia indukciós görbe felfutása az  $F_0$  szintről az  $F_m$  szintre, DCMU jelenlétében egy adott fényintenzitás mellett, csak a PS II abszorpciós hatáskeresztmetszetétől függ (Melis és Thielen, 1980). A 14. ábra mutatja az autotróf és fotoheterotróf módon nevelt *Chlamydomonas stellata* fluoreszcencia indukciós görbe, DCMU jelenlétében mért felfutását. A fotoheterotróf

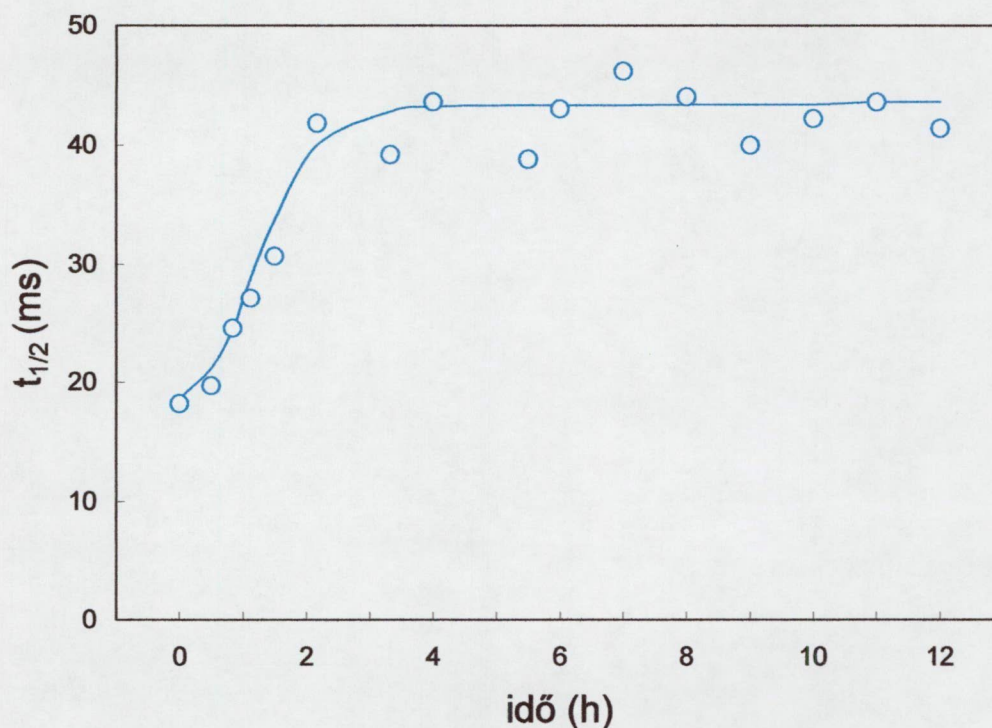


14. ábra. A fluoreszcencia indukció felfutási kinetikája 10  $\mu\text{M}$  DCMU jelenlétében autotróf (—) és ftoheterotróf (—) *Chlamydomobryns stellata* algában 20  $\text{W}/\text{m}^2$  aktinikus fényintenzitás mellett.. A görbéket azonos  $F_v$  értékre normáltuk.

algában a  $Q_A$  teljes redukciójának félideje (41 ms) hosszabb mint az autotróf algáé (19 ms). Meghatároztuk a fluoreszcencia indukciós görbe felfutás félidejének időbeli változását is az autotróf-fotoheterotróf átmenet során (15. ábra). A félidő hosszabodásának kinetikája jó korrelációt mutat a state 1/state 2 átmenetként értelmezett  $F_m$  csökkenésének kinetikájával (7. ábra). A  $Q_A$  redukció sebesség lassulása a state 1/state 2 átmenet alatt jelzi, hogy a state 1/state 2 átmenet valóban csökkenti a PS II antenna-komplex által begyűjtött, vagy a PS II reakciócentrumába továbbított fényenergia mennyiségét.

A legáltalánosabban elfogadott modell szerint (Allen, 1992) a state 1/state 2 átmenet az LHC II foszforilációjának eredményeként alakul ki.  $^{32}\text{P}$  izotópos ortofoszfát jelöléssel és a tilakoid fehérjék SDS poliakrilamid-gélelektroforézissel történő elválasztásával sikerült kimutatnunk, hogy a *Chlamydomobryns stellata* algában

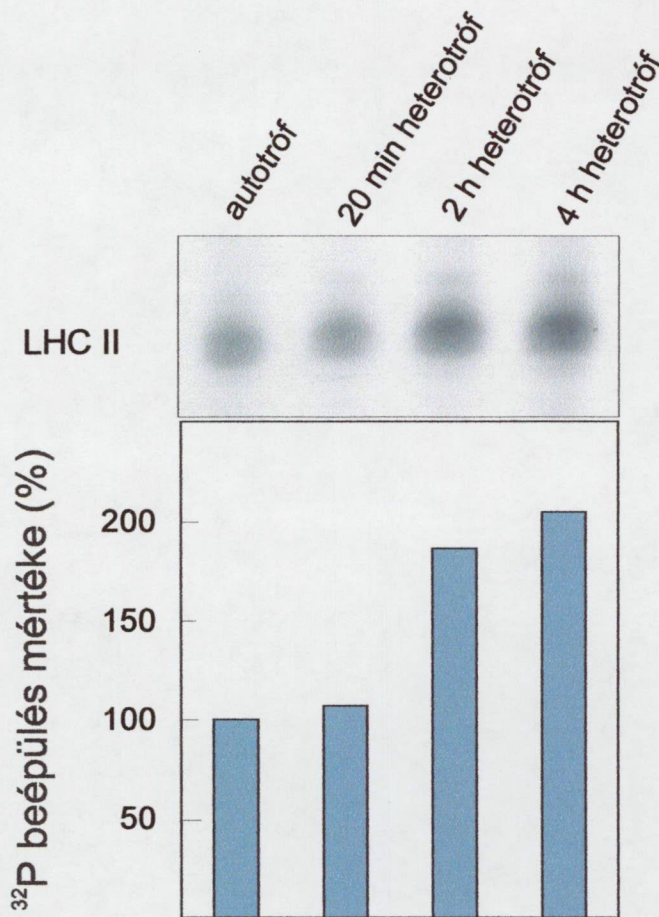




15. ábra. A  $Q_A$  fotokémiai redukció félidejének változása az autotróf-fotoheterotróf átmenet során *Chlamydomobotrys stellata* algában.

fotoheterotróf körülmények között az  $F_m$ , ill. az  $F_v$  csökkenését az LHC II nagymértékű foszforilációja kíséri (16. ábra).

Széles körben elfogadott, hogy a state átmenetek a két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő elektrontranszport komponensek redox potenciálja által szabályozottak, így kézenfekvő az a feltételezés, hogy az acetát metabolizmus a fluoreszcencia indukció, termolumineszcencia ill. oxigén fejlődés mérések segítségével kimutatott PQ redukción keresztül váltja ki a state 1/state 2 átmenetet. Ennek igazolására az acetát adással és a  $CO_2$  megvonással egyidejűleg, az elektrontranszportot különböző helyeken gátló herbicideket (DCMU, DBMIB) is adtunk. A DBMIB csaknem teljesen, míg a DCMU részlegesen megakadályozta ill. hosszú távon késleltette az acetát okozta fluoreszcencia kioltást: az  $F_m$  és a 685 ill. 695 nm-es alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia emissziós sávok csökkenését (6. és 13. ábra). A DCMU megakadályozza, hogy a PS II működése



16. ábra. Az autotróf-fotoheterotróf átmenet hatása *Chlamydomobryns stellata* LHC II foszforilációjára. Felső rész: A <sup>32</sup>P jelölt és SDS-PAGE-sel elválasztott LHC II autoradiogrammja. Alsó rész: Az autoradiogramm denzitometriás analízise. A mért értékek az autotróf kontroll százalékában vannak kifejezve.

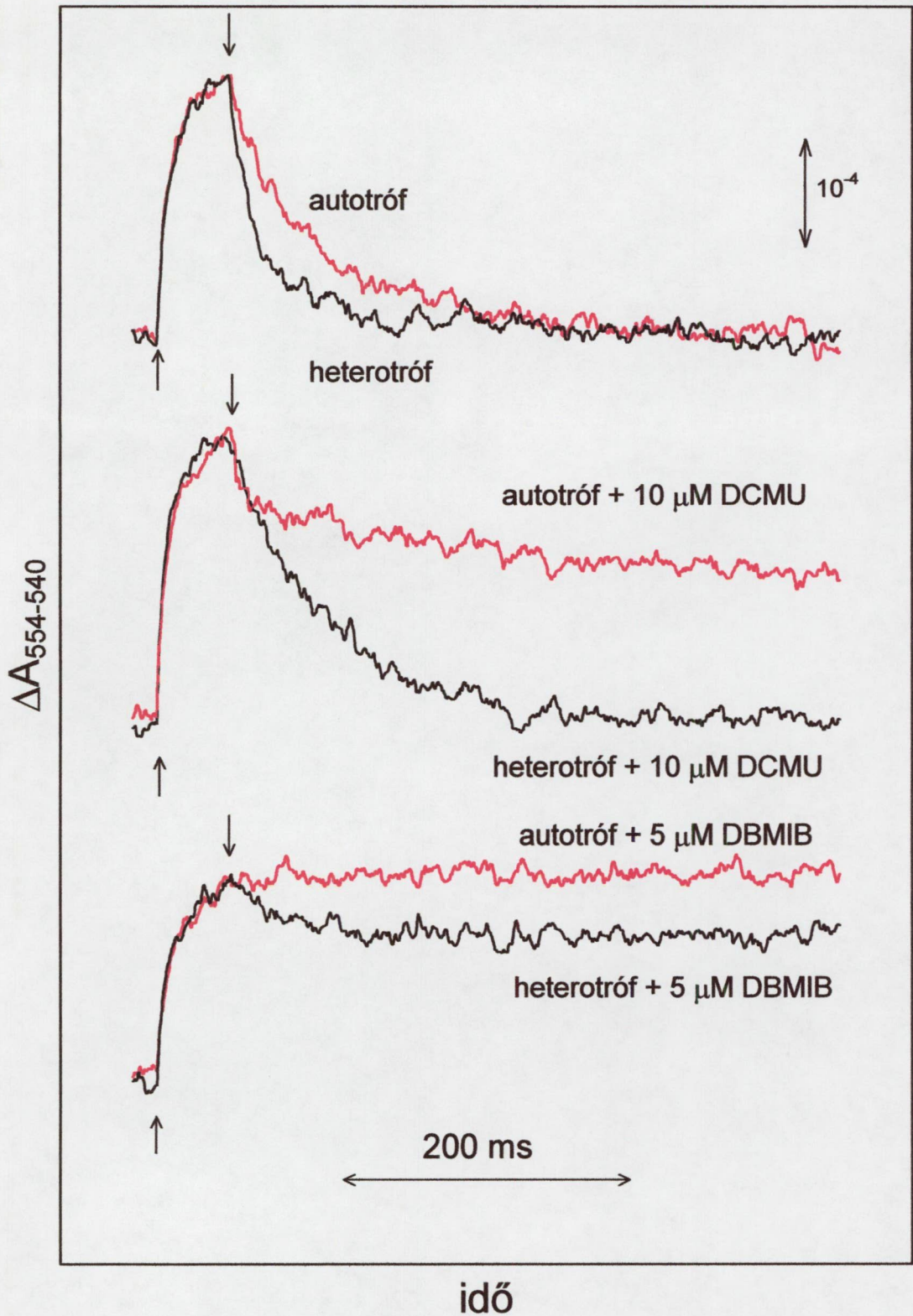
révén a vízbontásból származó elektronok eljussanak a PQ-hoz ill. a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplexhez. A DCMU hatása arra utal, hogy a PS II által katalizált elektronátadás nagy mértékben hozzájárul a PS I és PS II közötti elektrontranszport komponensek redukciójához. A DCMU részleges hatása azonban azt is mutatja, hogy valamilyen külső forrásból elektronok lépnek az elektrontranszportba a DCMU hatóhelye után. A DBMIB megakadályozza a redukált PQ oxidációját, így a PQ redukált állapotban marad, a citokróm *f* pedig oxidáltá válik. DBMIB jelenlétében a state 1/state 2 átmenet nem következik be, annak ellenére, hogy a PQ redukált állapotban marad. Ez a megfigyelés azt valószínűsíti, hogy az acetát metabolizmus által indukált



state 1/state 2 átmenetet nem a PQ, hanem a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex valamely komponensének redukciója váltja ki.

A külső elektronforrásból a két fotokémiai rendszer közötti elektrontranszportláncba irányuló elektron beáramlás kinetikáját a citokróm *f* fény-indukált abszorpció változásának mérésével vizsgáltuk (17. ábra). 50 ms-os fényfelvillanás alatt a PS I által katalizált elektrontranszport a citokróm *f* oxidációját okozza, amit 540 nm-es referencia hullámhosszhoz viszonyított 554 nm-en mérhető abszorpció csökkenés kísér. Az oxidált citokróm *f* sötétben a redukált PQ molekulák segítségével jut vissza redukált állapotba, miközben az abszorpció az eredeti értékre áll vissza. A citokróm *f* fényfelvillanást követő redukciója 20 mM acetát hatására felgyorsul a redukált PQ megnövekedett koncentrációja miatt. DCMU jelenlétében a kontroll alga citokróm *f* redukciója lelassul, mivel a Q<sub>A</sub>-Q<sub>B</sub> elektron átadás gátlása miatt a PQ oxidált állapotban marad. Az acetát metabolizmus által indukált gyors citokróm *f* redukció azonban sokkal kevésbé érzékeny a DCMU-ra, ami érthető, ha az elektronok a DCMU kötőhely után, a PQ-nál, vagy a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplexnél lépnek be az elektrontranszportláncba. A DBMIB viszont mind a kontroll, mind az acetátos algában lassítja a citokróm *f* sötét redukcióját. A DBMIB megakadályozza a redukált PQ bekötődését a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex Q<sub>o</sub> kötőhelyére, ami igazolja, hogy az elektronok nem közvetlenül, hanem a PQ közvetítésével jutnak a citokróm *f*-hez.

Az acetát metabolizmus többféle módon is redukciót idézhet elő a fotoszintetikus elektrontranszportláncban. Az acetát fotoasszimiláció a glioxilsav-ciklusban ill. glükoneogenezisben netto NADH termeléssel jár. A NADH a citoplazmából a kloroplasztisza juthat a trióz-foszfát vagy az oxálacetát-malát sőtön keresztül, miközben a NADH NADPH-vá konvertálódik. A NADPH koncentráció növekedéséhez vezet a Calvin-ciklus gátlása is. A ftoheterotróf tenyészetekben a



17. ábra. Az acetát metabolizmus hatása a fényindukált citokrómf abszorpció változás kinetikájára. (—) autotróf alga; (—) 2 óráig heterotróf körülmények között nevelt alga. Az elektrontranszport inhibitorokat fél perccel a mérés előtt adtuk a mintákhoz. ↑: aktinikus fény be; ↓: aktinikus fény ki



CO<sub>2</sub> hiánya leállítja a Calvin-ciklust, de az acetát metabolizmus önmagában is képes a Calvin-ciklus gátlására. Az acetát fotoasszimiláció első lépése, az Ac-CoA képződése megnöveli az ATP felhasználást. A Calvin-ciklus és a glioxilsav-ciklus versengése az ATP-ért lecsökkenti a sejt ATP koncentrációját, így a kloroplasztisz legfőbb NADPH fogyasztó folyamata, a Calvin-ciklus még a mixotróf tenyészetekben, CO<sub>2</sub> jelenlétében is leáll és a fotoszintézis fény szakaszában képződő NADPH felhalmozódik. Ennek igazolására meghatároztuk a NADPH és az ATP koncentrációkat autotróf kontroll ill. 30 percig 20 mM acetáttal kezelt algasejtek extraktumából (3. táblázat). Az acetát hatására az ATP tartalomban kb. 50 %-os csökkenés figyelhető meg a NADPH szint több mint kétszeres emelkedésével

3. táblázat. Az acetát metabolizmus hatása *Chlamydomobryns stellata* alga sejtek NADPH és ATP koncentrációjára. Az algasejteket 30 percig inkubáltuk 20 mM acetát jelenlétében.

	NADPH	ATP
	(nM/mg klorofill)	
Autotróf	19,9 ±3,8	91,7 ±5,7
Fotoheterotróf	43,3 ±6,4	48,2 ±7,9

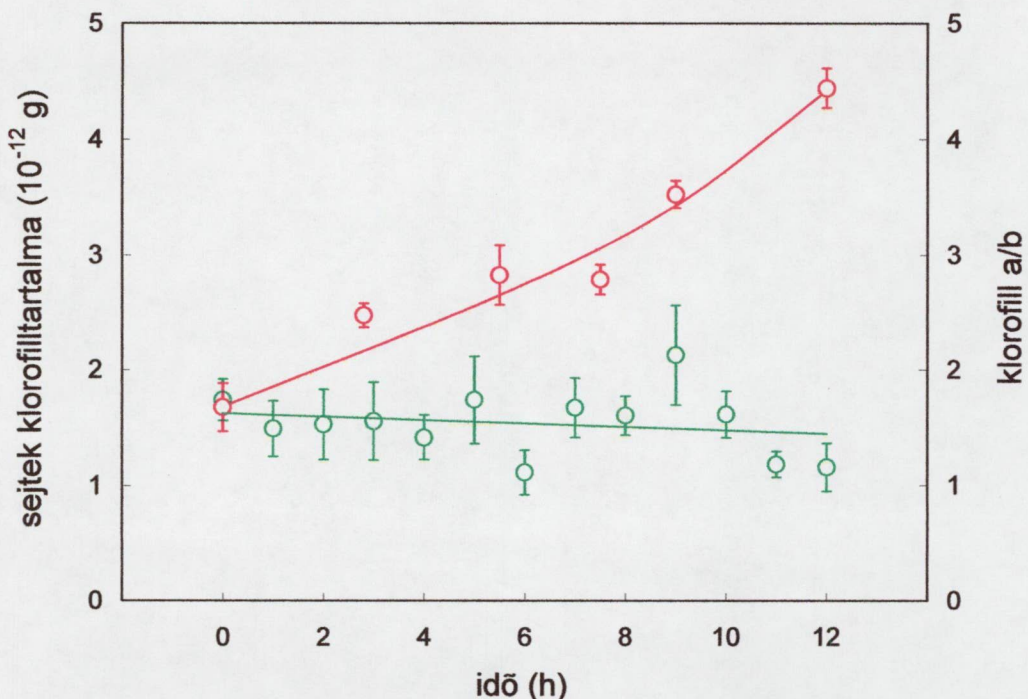
egyidejűleg. A NADPH molekulákról az elektronok a tilakoid membránban található NAD(P)H-plasztokinon oxidoreduktáz segítségével közvetlenül a PQ molekulákra kerülhetnek, vagy a ferredoxin-NADPH reduktáz (FNR) először a ferredoxint redukálja, majd a ferredoxinról a ferredoxin-plasztokinon oxidoreduktáz, az FQR katalízisével kerülnek a PQ-ra. A PS I akceptor oldalának redukciója miatt a PS I elektrontranszport kapacitása lecsökken a PS II-éhez viszonyítva, így a PS II a NADPH akkumulációjától függetlenül is, közvetlenül hozzájárul a PQ és citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex redukációjához. Sötétben az acetát a PQ kismértékű redukcióját idézi

csak elő és sem a state 1/ state 2 átmenet, sem az oxigénfejlődés csökkenése nem figyelhető meg, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy a NADPH akkumulációjáért elsősorban a fény által hajtott lineáris elektrontranszport a felelős, míg a glioxilsav-ciklus hozzájárulása kisebb mértékű. A DCMU részleges gátló hatása a state 1/state 2 átmenetre ill. a PQ redukcióra szintén azt mutatja, hogy a glioxilsav-ciklus által termelt redukáló erő önmagában nem elegendő a PQ olyan mértékű redukációjához ami a state 1/state 2 átmenet kiváltásához elegendő lenne. Az ATP hiányának, a Calvin-ciklus gátlásán keresztül, a NADPH akkumulációban betöltött elsődleges szerepét támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a piroszőlősav adása, amely szintén csökkenti a sejt ATP tartalmát (Horton, 1985), az acetáthoz hasonló hatással van a fluoreszcencia indukcióra (6. ábra).

### **Az acetát fotometabolizmus hatása a PS I/PS II sztöichiometriára**

Az acetát metabolizmusra való áttérés során a fluoreszcencia indukció, termolumineszcencia és az oxigénfejlesztő képesség változásaiban megfigyelhető lassú, 2-12 óra alatt lezajló változások magyarázatára a két fotokémiai rendszer mennyiségi arányának megváltozását tételeztük fel. Erre utal a korábbiakban bemutatott 77 K-es fluoreszcencia emissziós spektrum megváltozása is, ill. az algasejtek pigmenttartalmában bekövetkező változások is. Az autotróf-fotoheterotróf átmenet során a sejtek összklorofill tartalma ugyan nem változott meg, de a klorofill *a/b* arány jelentősen megnövekedett (18. ábra). A PS I klorofill *a* tartalma nagyobb mint a PS II-é, így a klorofill *a/b* arány növekedése összhangban van azzal a feltevésünkkel, hogy a PS I/PS II arány a fotoheterotróf életmód során megnövekszik. A PS II mennyiségének csökkenésével a sejt klorofill tartalma csökken, de a PS I ill.

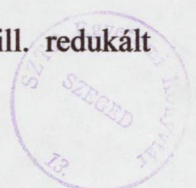




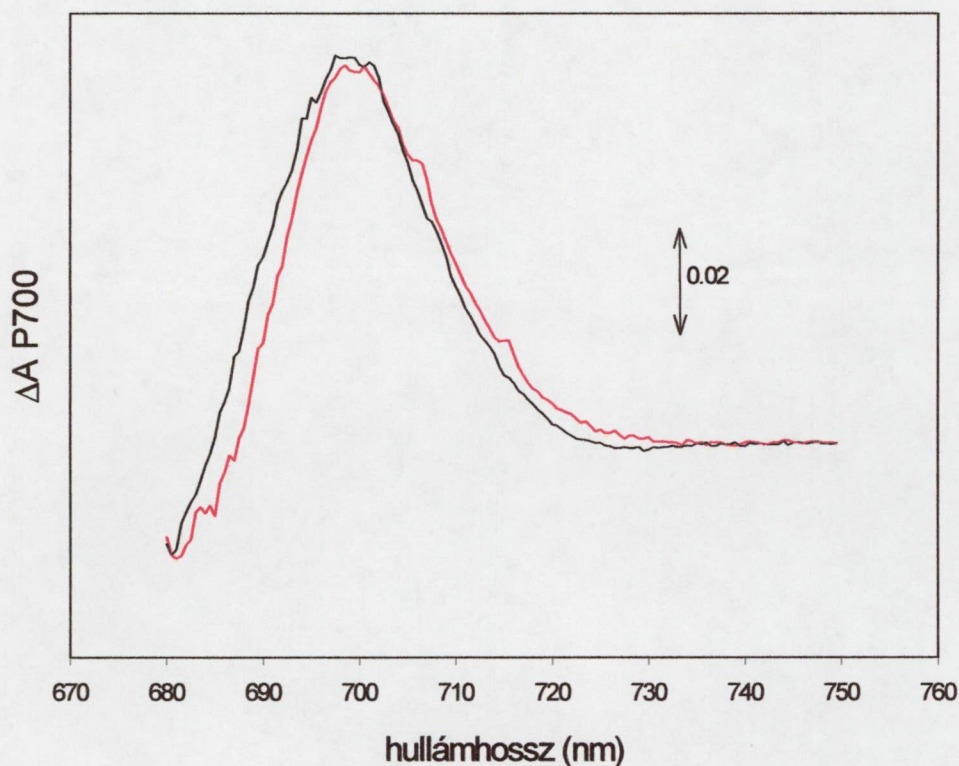
18. ábra. *Chlamydomobryts stellata* sejtek klorofilltartalmának és klorofill *a/b* arányának változása autotróf-fotoheterotróf átmenet során. Az algát 12 órán át neveltük fotoheterotróf körülmények (20 mM acetát,  $-\text{CO}_2$ ) között. Minden mérési pont 4-6 mérés átlaga. —○—, klorofill *a/b*; —○—, klorofill tartalom

annak fénybegyűjtő antenna pigment-protein komplexeinek mennyiségi növekedése miatt az összklorofill tartalom nem változik. Brandt és mtsai. (1982, 1983) *Chlamydomobryts stellata* algában egy új, a PS I-hez tartozó, csak klorofill *a*-t tartalmazó fénybegyűjtő klorofill-protein komponenst azonosítottak, amely az autotróf algában kis mennyiségben fordul elő, de fotoheterotróf nevelési körülmények között a mennyisége megnövekszik.

A klorofill *a/b* arányból csak a két fotokémiai rendszer relatív arányának megváltozására következtethetünk. A PS I ill. PS II abszolút változásait a reakciócentrum fehérjékhez kapcsolódó funkcionális elemek koncentrációiból határoztuk meg. A PS I mennyiségét a P700 tartalommal jellemeztük, amit izolált tilakoidokból spektroszkópiai módszerrel határoztunk meg. A P700 reakciócentrumokat kémiaiilag redukáltuk, majd oxidáltuk és az oxidált ill. redukált



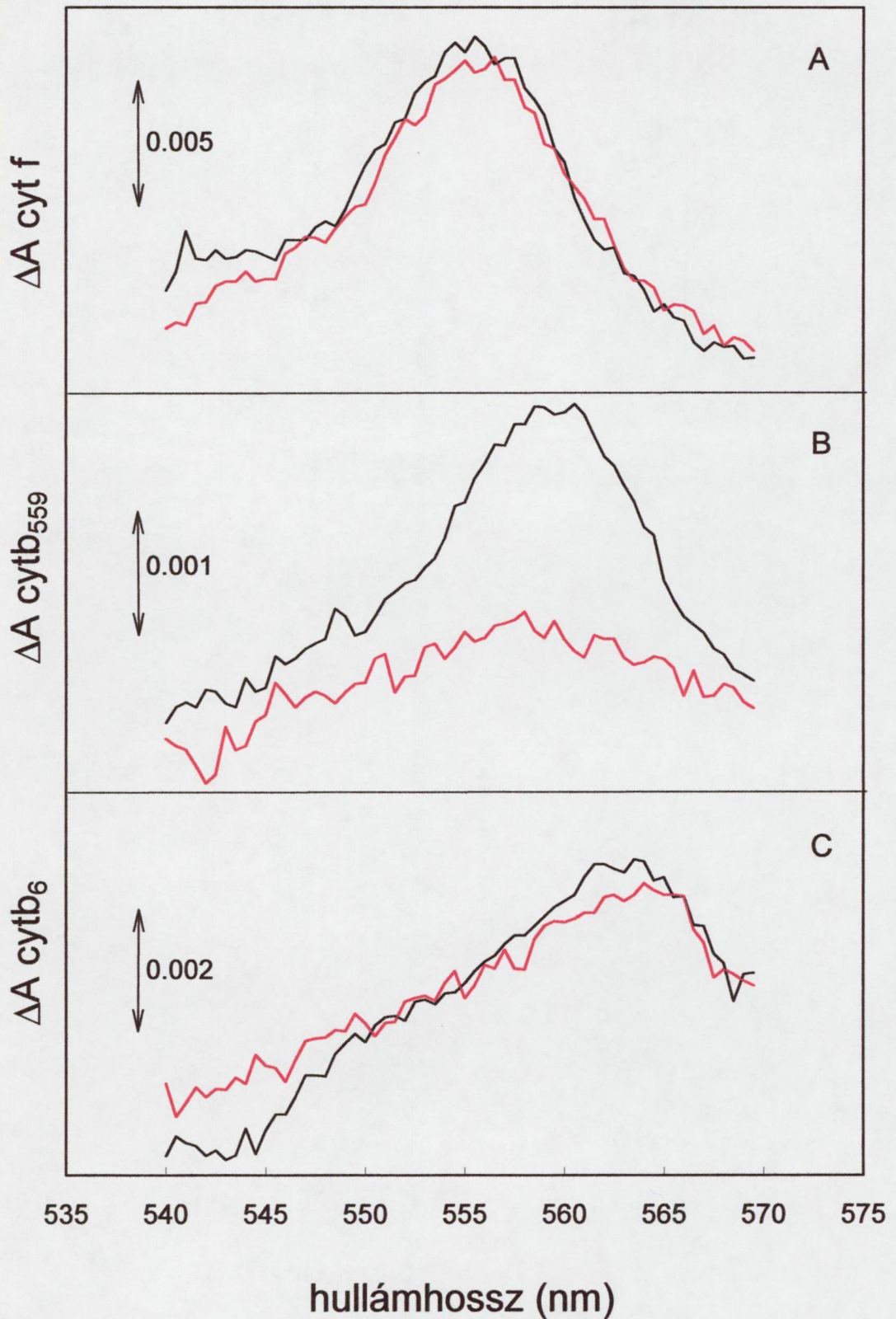
formák abszorpciós spektrumainak különbségéből határoztuk meg a P700 mennyiségét (19. ábra). A PS II mennyiségét a citokróm  $b_{559}$  mennyiségével jellemeztük. A citokróm  $b_{559}$  a P700-hoz hasonlóan, a tilakoid membrán egyéb



19. ábra. Kémiaailag oxidált (1 mM ferri-cianid) és redukált (aszkorbinsav) P700 különbségi abszorpciós spektruma autotróf (—) és ftoheterotróf (—) körülmények között nevelt *Chlamydothrys stellata* tilakoid membránjaiból.

citokróm komponenseivel együtt (citokróm  $b_6$ , citokróm  $f$ ) könnyen meghatározható spektroszkópai módszerekkel. A három citokróm komponens redox potenciálja elég távol van egymástól ahhoz, hogy az előzetesen kémiaailag oxidált formákat megfelelően megválasztott redukáló szerekkel szekvenciálisan, egymástól függetlenül redukáljuk, és az ezzel járó abszorpcióváltozásokat megmérjük (20. ábra). Bár az irodalom ellentmondásos az egyetlen PS II komplexre jutó citokróm  $b_{559}$  hem csoportok számát illetően (Lam és mtsai., 1983; Murata és mtsai., 1984; MacDonald és mtsai., 1994; Yruela és mtsai., 1994; Tang és Diner, 1994), a PS II mennyiségét a





20. ábra. Autotróf (—) és fotoheterotróf (—) *Chlamydomonas stellata* algából izolált tilakoid membránok citokróm komponenseinek kémiai redukált és oxidált formáinak különbségi spektruma. A: cyt *f*, hidrokinnal redukált-ferri-cianid oxidált minta; B: cyt *b*<sub>559</sub>, aszkorbáttal redukált-hidrokinnal redukált minta; C: cyt *b*<sub>6</sub>, ditionittal redukált-aszkorbáttal redukált minta



citokróm  $b_{559}$  mennyiségének felével vettük azonosnak. A citokróm  $b_6$  és citokróm  $f$  koncentrációjából a citokróm  $b_6/f$  mennyiségét tudtuk megbecsülni. A spektroszkópiai módszerekkel nyert adatokat a 4. táblázat foglalja össze. A citokróm  $b_6/f$  komplex

4. táblázat. A PS II, PS I és citokróm  $b_6/f$  komplex mennyisége autotróf és ftoheterotróf *Chlamydothrys stellata* sejtekben. A PS II és PS I mennyiségét a cyt  $b_{559}$  mennyiség felével ill. a P700 tartalommal jellemeztük. A citokróm  $b_6/f$  komplex mennyiségét a cyt  $f$  ill. a cyt  $b_6$  koncentráció alapján számoltuk.

	PS II	PS I	Cyt $b_6/f$	PS I/PS II
	(μmol/mg klorofill)			
Autotróf	1,72±0,32	1,37±0,23	1,78±0,38	0,79
Fotoheterotróf	0,65±0,13	1,75±0,34	1,66±0,46	2,69

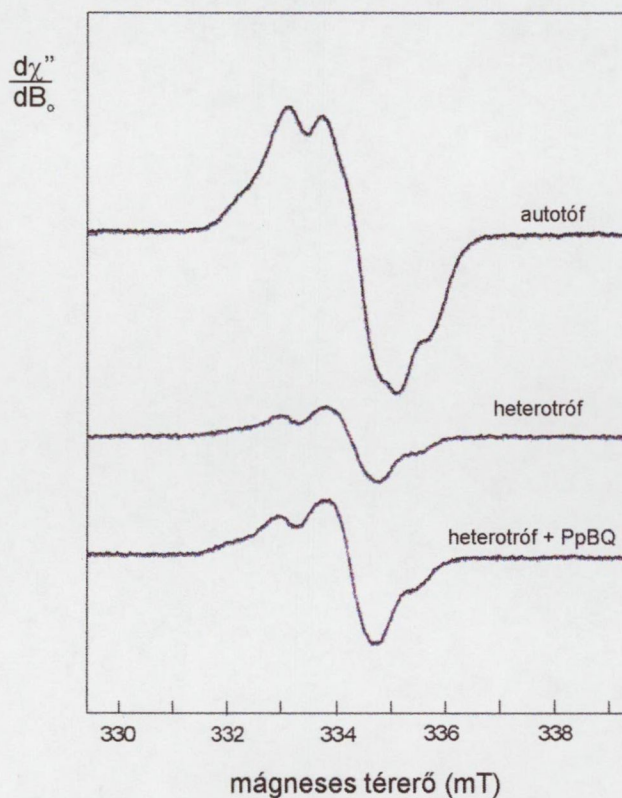
mennyisége nem különbözik az autotróf ill. ftoheterotróf módon nevelt algákban, míg a PS II mennyisége jelentősen lecsökkent, és a PS I mennyisége kisebb mértékben növekedett. A PS I/PS II arány tehát megnőtt, és ez az arány változás elsősorban a PS II számának csökkenéséből adódik, a PS I koncentrációjának növekedése csak kisebb mértékben járul hozzá. Ez az eredmény összhangban van Pfannschmidt és mtsai. (1999) eredményeivel, miszerint a PS I/PS II arány a PS II fényben nevelt borsó növényekben megnövekszik, míg a PS I fényben neveltekben lecsökken a PS I és PS II ellentétes irányú változásai miatt. Ezzel szemben Murakami és Fujita (1991) ill. Aizawa és mtsai. (1992) kimutatták, hogy cianobaktériumokban a fényviszonyok megváltozása által indukált PS I/PS II sztöichiometriai változásokban a PS I a változó komponens, a PS II és citokróm  $b_6/f$  komplex mennyisége változatlan marad.

A PS II reakciócentrumok mennyiségi változását egy, a citokróm  $b_{559}$  meghatározásától független módon is sikerült igazolni. A PS II reakciócentrum egyik fő fehérjéjének, a PsbD-nek (D2), a tyr160 aminosav oldallánca megvilágítás hatására



oxidálódik, és a  $\text{tyrD}^+$  szobahőmérsékleten is mérhető, sötétben hosszú ideig stabil ESR jelet ad, amely arányos a PS II reakciócentrum mennyiségével. A ftoheterotróf algában a  $\text{tyrD}^+$ -hez tartozó  $g=2,0046$  ESR jel sokkal kisebb, mint az autotróf algában mérhető (21. ábra). A ftoheterotróf algában PpBQ hatására sem nő meg az ESR sáv amplitudója, ami bizonyítja, hogy a  $\text{tyrD}^+$  ESR jele nem a ftoheterotróf algában tapasztalható erős redukzív körülmények miatt nem mérhető, hanem a jelet adó  $\text{tyrD}$  mennyiségének csökkenése következtében.

A reakciócentrumok funkcionális komponensei mellett, immunoblottal összehasonlítottuk a reakciócentrum apoproteinek mennyiségét az autotróf ill. 12 órán át ftoheterotróf módon nevelt algákban (22. ábra). A PsbA ill. PsaA fehérjék ellenanyagaival végzett vizsgálatok eredményei jól korrelálnak a spektroszkópai



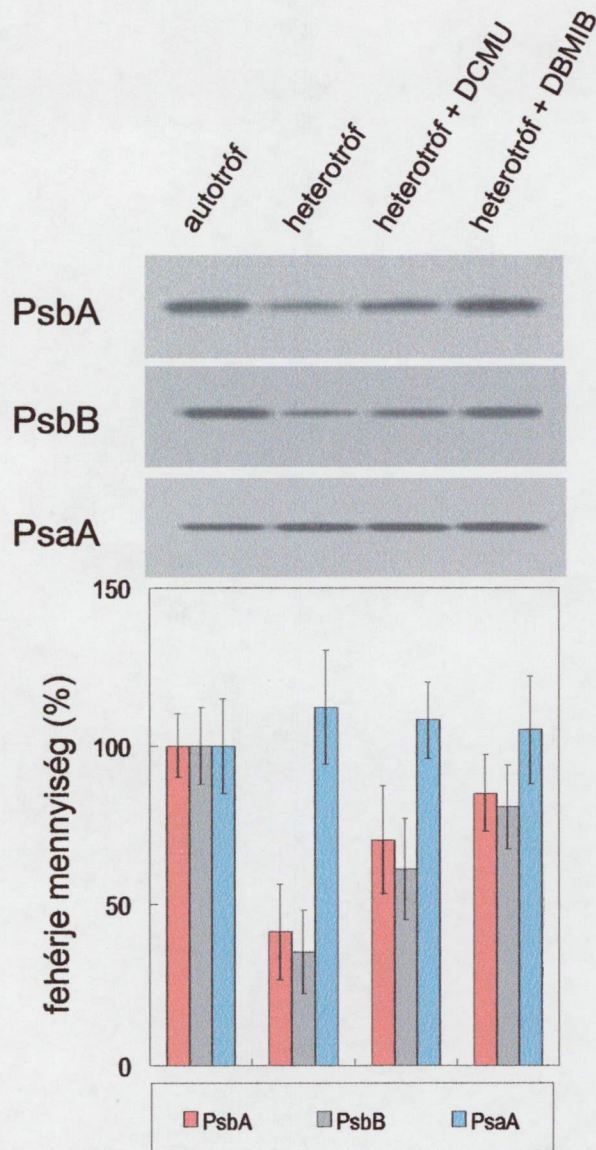
21. ábra. A  $\text{tyrD}^+$  ESR spektruma autotróf és 16 órán keresztül ftoheterotróf módon nevelt *Chlamydomobryx stellataban*. 2 mg/ml klorofill koncentrációjú mintákat  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5 percig megvilágítottuk, majd 15 perc sötétadaptálás után felvettük a spektrumot  $200\text{ }\mu\text{W}$  teljesítményű  $9,42\text{ GHz}$ -es mikrohullámú gerjesztéssel.

módszerekkel nyert adatokkal. A PS II reakciócentrum fehérjéje a PsbA kb. 65 %-kal csökkent, a PS I reakciócentrum fehérje a PsaA kis mértékben megnőtt, alátámasztva a PS II dinamikus szerepét a PS I/PS II sztöichiometria kialakításában. A PsbA fehérje az elsődleges hatóhelye a fénygátlásnak, így felmerül az a lehetőség, hogy a ftoheterotróf nevelés során fellépő reduktív körülmények elősegíthetik a PsbA fehérje degradációját, és ez vezet a PS II reakciócentrumok mennyiségének csökkenéséhez. A fénygátlás szerepének tisztázására, a PsbA mellett, egy másik, szintén a PS II-höz tartozó, de a fénygátlásra nem, ill. sokkal kevésbé érzékeny fehérje, a PsbD mennyiségét is megvizsgáltuk az autotróf és ftoheterotróf algákban. A PsbD mennyisége a PsbA-val azonos mértékben csökken le a ftoheterotróf algában. A PsbD a PS II belső fénybegyűjtő antenna komplexét alkotja, így megállapítható, hogy a ftoheterotróf algában a teljes PS II komplex mennyisége változik, és nem a PsbA protein specifikus degradációjáról van szó.

DCMU vagy DBMIB jelenlétében a ftoheterotróf algában a PsbA és a PsbD fehérjék mennyisége csak kis mértékben csökken, megerősítve a feltételezést, hogy a state átmenetekhez hasonlóan a PS I/PS II sztöichiometria is az elektrontranszportlánc redox állapotának szabályozása alatt áll, és valószínűleg itt is a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex a redox szenzor, amelynek a redox állapota meghatározza a két fotokémiai rendszer mennyiségét az azokat felépítő fehérjék szintézisére és/vagy degradációjára gyakorolt hatásán keresztül.

A PS I/PS II arány változása jól tükröződik a kloroplasztisz ultrastrukturájának megváltozásában is. Régebbi elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján (Wiessner és Amelunxen, 1969) ismert, hogy a ftoheterotróf *Chlamydomonas stellata* kloroplasztiszában az elsősorban PS I-et tartalmazó sztróma tilakoidok mennyisége megnövekszik a túlnyomó többségében PS II-t tartalmazó gránum tilakoidok



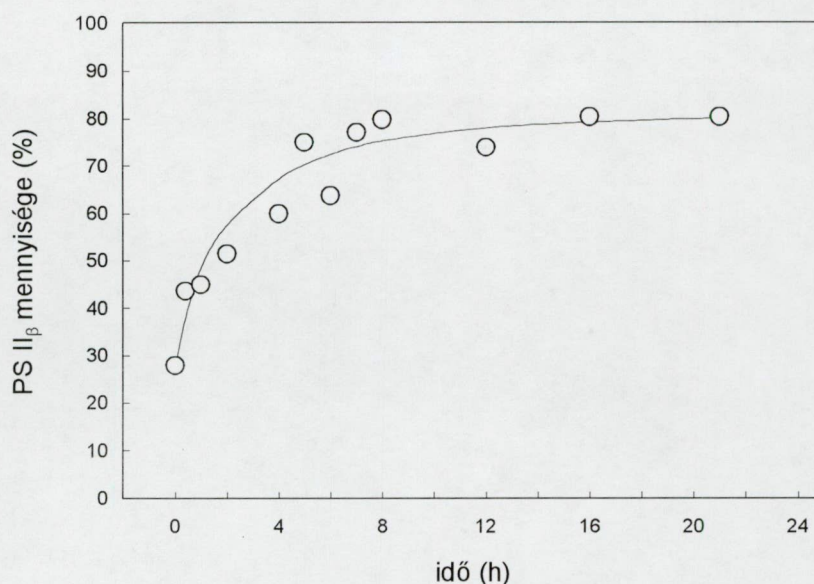


22. ábra. Nevelési körülmények és fotoszintetikus inhibitorok hatása a PsbA, PsbB és PsaA fehérjék mennyiségére *Chlamydomonas stellata* algában. Felső rész: 16 órán át autotróf és heterotróf körülmények között, ill. heterotróf körülmények között és 10  $\mu\text{M}$  DCMU vagy 5  $\mu\text{M}$  DBMIB jelenlétében nevelt algák immunoblott analízise. A DBMIB-t 3 óránként pótoltuk. Alsó rész: Az immunoblott lézer denzitometriás analízise. Az adatok 3 független mérés átlagai és az autotróf kontroll százalékában vannak kifejezve.

mennyiségének rovására. Melis és Homann (1976) DCMU jelenlétében mért fluoreszcencia indukció görbe kinetikájának elemzésével kétféle, antenna méretükben különböző PS II reakciócentrumot különített el, amelyeket PS II $_{\alpha}$  és PS II $_{\beta}$  centrumoknak nevezték el. A kétféle PS II komplex lokalizációja is eltérő. Míg a nagyobb fénybegyűjtő antennával rendelkező PS II $_{\alpha}$  a gránum tilakoidokban, addig a



kisebbs abszorpciós hatáskeresztmetszetű PS II<sub>β</sub> a sztróma tilakoidokban található (Melis, 1991). Mivel a sztróma tilakoidok mennyisége nagyobb a ftoheterotróf algában mint az autotróf algában, meghatároztuk a kétféle reakciócentrum százalékos megoszlásának változását az autotróf-fotoheterotróf átmenet során (23. ábra). Megállapítottuk, hogy a ftoheterotróf algában a megmaradó PS II reakciócentrumok többsége, 80 %-a β-centrum, míg az autotróf algában ez az arány csak kb. 30 % volt.



23. ábra. A PS II<sub>β</sub> reakciócentrumok relatív mennyiségének változása az autotróf-fotoheterotróf átmenet során *Chlamydomonas stellata* sejtekben. Az értékek a teljes PS II (α+β) mennyiségének százalékában vannak megadva.

A PS II<sub>α</sub> / PS II<sub>β</sub> arányváltozás fiziológiai jelentősége nem tisztázott. Wendler és Holzwarth (1987) szerint a state 1/state 2 átmenet során a foszforilált LHC II nem a PS I-hez, hanem a PS II<sub>β</sub> centrumokhoz kapcsolódik és a sztróma tilakoid membránban szabadon mozgó PS II<sub>β</sub> képes az általa abszorbeált energiát a PS I-nek átadni. Chylla és mtsai. (1987) a Q<sub>A</sub> redukció sebességére nézve szintén heterogénnek találták a spenót tilakoid membránokban előforduló PS II reakciócentrumokat. Az aktív reakció centrumok mellett a Q<sub>A</sub>-t egy nagyságrenddel lassabban redukáló

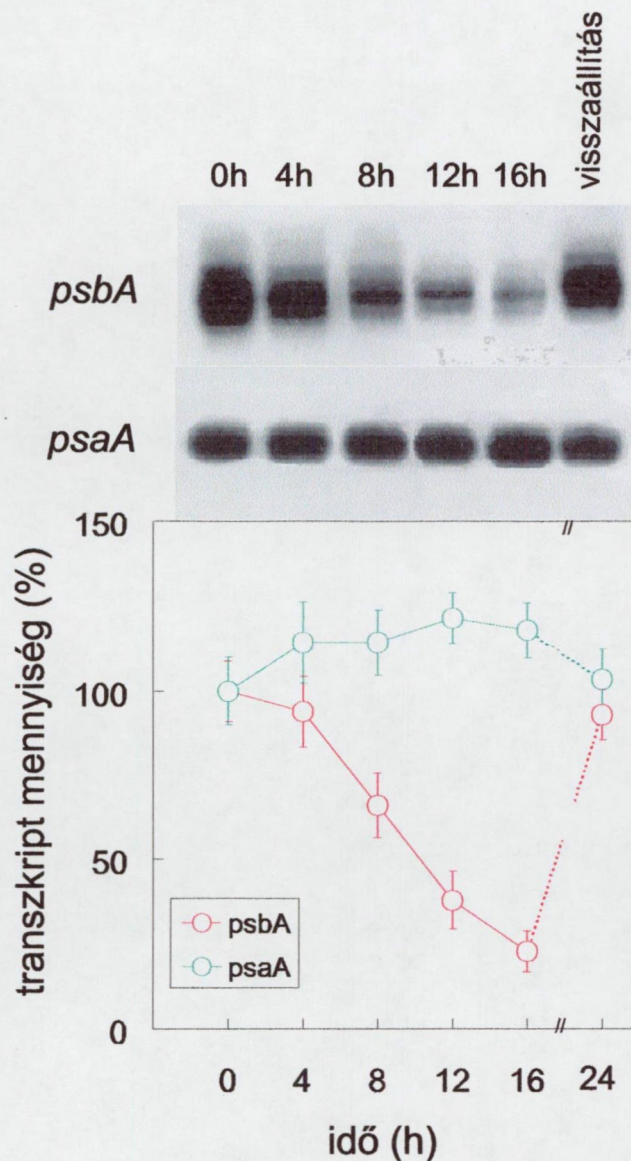
reakciócentrumokat mutattak ki, amely vagy átfed a PS II<sub>β</sub> reakciócentrum populációval vagy annak részét képezi. A Q<sub>B</sub> redukciójára képtelen PS II<sub>β</sub> centrumok felhalmozódása a heterotróf sejtekben szerepet játszhat a PS II aktivitásának csökkenésében, és így a két fotokémiai rendszer aktivitásának egyensúlyba kerüléséhez. A sztróma tilakoidokban elhelyezkedő PS II<sub>β</sub> centrumokat Melis (1991) az aktív PS II komplex fehérjekomponenseiből történő összeállítás egyik közbülső termékének tartja. A Q<sub>B</sub> redukciójára nem képes PS II<sub>β</sub> centrumok először a Q<sub>B</sub> redukciójára képes PS II<sub>β</sub> centrumokká, majd aktív PS II<sub>α</sub> centrumokká alakulnak. Elképzelhető hogy az aktív PS II képződése poszt-transzlációs szabályozás alatt áll, és a PS II<sub>β</sub> felhalmozódása a fotoheterotróf *Chlamydomonas stellata* kloroplasztiszokban a PS II<sub>β</sub> centrumok aktív PS II<sub>α</sub> centrumokká alakulásának gátlása miatt következik be.

### **Az acetát metabolizmus hatása a *psbA* és *psaA* gének expressziójára**

Allen (1992, 1995) javaslata szerint a fényviszonyok megváltozása az elektrontranszportlánc redox állapotának megváltoztatásával a PS II és PS I fehérjék génjeinek expresszióját befolyásolja. A PS I nevelő fényről PS II fényre való áttérés a PQ vagy a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex redukcióján keresztül olyan jelátviteli folyamatot, feltehetőleg foszforilációs kaszkádot indít el, amely a PS II gének transzkripciójának gátlásához és a PS I gének transzkripciójának fokozásához vezet. Ha Allen hipotézise helyes, akkor feltételezhető, hogy az acetát metabolizmus által kiváltott redukció is a génexpresszió befolyásolásával szabályozza a PS I/PS II arányt. Ennek a feltételezésnek az ellenőrzéséhez megmértük a *psbA* és *psaA* gének transzkript szintjének időfüggését az autotróf-fotoheterotróf átmenet során (24. ábra). A *psbA*



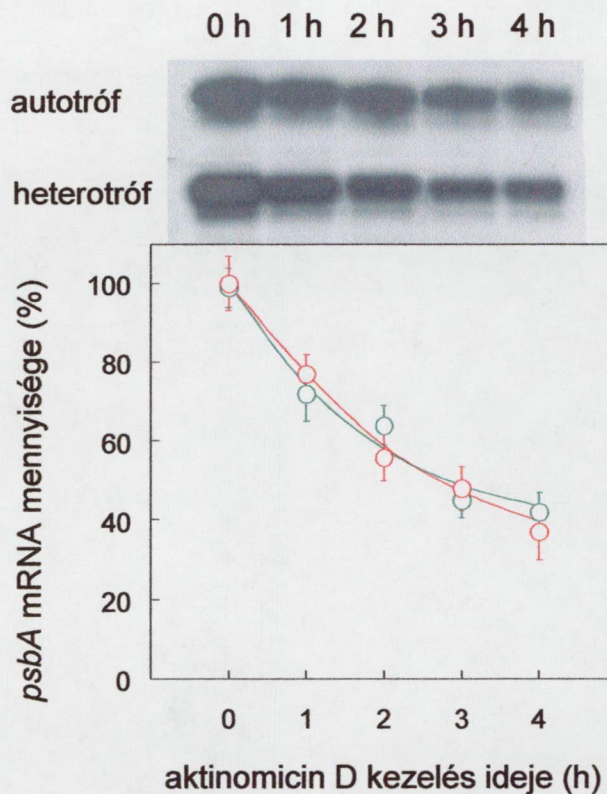
mRNS mennyisége fokozatosan csökken a *psaA* mRNS mennyiségének csekély mértékű növekedésével párhuzamosan. 16 óra fotheterotróf nevelés után a *psbA* transzkript szintje az autotróf szint 25%-ra csökken, a *psaA* mRNS kb. 10%-kal emelkedik. Ha az algákat 16 órai fotheterotróf nevelés után visszahelyezzük autotróf körülmények közé, az eredeti mRNS szintek 6-8 órán belül teljes mértékben visszaállnak az eredeti értékre.



24. ábra. A *psbA* és *psaA* mRNS-ek mennyiségének változása *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben fotheterotróf nevelés során. 16 óra nevelés után az algatenyészetet újra autotróf körülmények közé helyeztük vissza. Felül: az S1 nukleáz analízis autoradiogramja; alul: az autoradiogram denzitometriás analízise. Minden mérési pont 3 független mérés átlaga az autotróf kontroll százalékában kifejezve.



Az mRNA-ek mennyisége a sejtben megváltozhat a transzkripció sebességének változása miatt, vagy, ahogy több eukarióta sejtben is kimutatták, az mRNA-ek stabilitásának megváltozása következtében (Deng és Gruissem, 1987; Mullet és Klein, 1987). A *psbA* mRNA stabilitásának meghatározásához a transzkripciót aktinomicin D-vel gátoltuk, az autotróf és ftoheterotróf algákban, majd meghatároztuk a *psbA* mRNA mennyiségének csökkenési sebességét (25. ábra). A *psbA* mRNA felezési



25. ábra. A *psbA* mRNA élettartama autotróf (—○—) és heterotróf (—○—) *Chlamydomobryns stellata* alga sejtekben. 2 órasi nevelés után 100 µg/ml aktinomicin D transzkripció gátló antibiotikumot adtunk az alga kultúrákhoz. Felül: az S1 nukleáz analízis autoradiogramja; alul: az autoradiogram denzitometriás analízise. Minden mérési pont 3 független mérés átlaga.

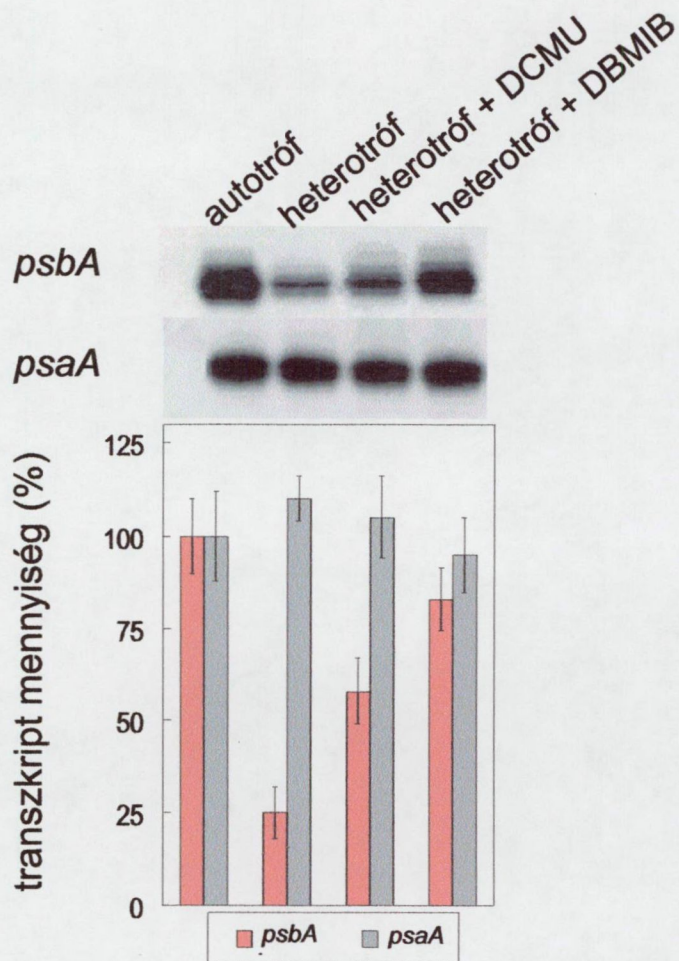
ideje a két mintában azonos volt. Az eredményül kapott 4 óra megegyezésben van az irodalomban az eukarióta *psbA* mRNA élettartamára vonatkozó adatokkal (Deshpande és mtsai., 1997). Az RNS stabilitás változására nyert adatok alapján valószínűsíthetjük, hogy a ftoheterotróf sejtekben a *psbA* transzkript szintjének



csökkenése a transzkripció sebességének csökkenéséből adódik.

Az elektrontranszport redox állapota és a *psbA* transzkript mennyisége közötti összefüggést DCMU és DBMIB jelenlétében végzett mérésekkel igazoltuk (26. ábra). DCMU jelenlétében a heterotróf alga *psbA* transzkript szintje sokkal magasabb mint DCMU nélkül, DBMIB jelenlétében pedig csaknem az autotróféval megegyező. Az elektrontranszport gátlók hatásai azt bizonyítják, hogy a *psbA* génexpressziója transzkripcionális szinten redox szabályozás alatt áll és az acetát metabolizmus az elektrontranszportlánc két fotokémiai rendszer közötti komponenseinek redukciójával a *psbA* gén expresszióját csökkenti.

A transzkript szint változások összhangban vannak a PsbA és PsaA fehérjék mennyiségében tapasztalt változásokkal. Az mRNS mennyiségi változásai elegendőek a megfelelő fehérjék mennyiségében tapasztalt változások magyarázatára, de nem zárhatók ki a translációs ill. poszt-transzlációs szintű szabályozási folyamatok sem. *Synechocystis* kékalgában, ahol a PS I/PS II sztöichiometria a PS I mennyiségén keresztül szabályozott, a citkróm *b<sub>6</sub>f* komplex redukciója a PS I reakciócentrum fehérjéinek (PsaA/B dimér) mennyiségét poszt-transzlációs szinten szabályozza, míg a PS II mennyisége a *psbA* mRNS mennyiségével együtt állandó marad (Aizawa és Fujita, 1997). Ellentétben a *Chlamydomonas stellata* zöldalgán kapott eredményeinkkel, *Synechocystis* kékalga sejtekben, a PsaA/B fehérje prekursor akkumulálódik, a megfelelő transzkript szintjének megemelkedése nélkül és A cianobaktériumokat gyakran használják modell rendszerként a növények fotoszintézisének vizsgálatához a fotoszintetikus apparátusuk nagyfokú hasonlósága miatt. Az eukarióta növények és cianobaktériumok genomjának szerveződése azonban már lényegesen különbözik egymástól, így nem szükségszerű, hogy a fotoszintetikus fehérjék szerkezeti és működési hasonlósága a genetikai szabályozottság terén is



26. ábra. Elektrontranszport inhibitorok hatása az acetát metabolizmus által indukált *psbA* és *psbB* mRNS-ek mennyiségi változásaira *Chlamydomobtrys stellata* algában. A sejteket 16 óra hosszan neveltük autotróf és fotheterotróf körülmények között inhibitorok nélkül ill. 10  $\mu$ M DCMU vagy 5  $\mu$ M DBMIB jelenlétében. A DBMIB-t 3 óránként pótoltuk. Minden mérési pont 3 mérés átlaga az autotróf kontroll százalékában kifejezve. Felül: az S1 nukleáz analízis autoradiogramja, alul: az autoradiogram denzitometriás analízise.

érvényesüljön. Kéalgákban, szemben a növényekkel a PsbA fehérjét (D1 protein) egy géncsalád kódolja és a *Synechocystisben* és *Synechococcusban* két egymástól 25 aminosavban különböző D1 protein termelődik. a D1:1 és a D1:2. A két különböző fehérjét kódoló gének expressziója egymástól eltérően és fajtól függő módon szabályozódik (Alfonso és mtsai., 2000). *Synechocystisben* a D1:1 fehérjét kódoló *psbAI* gén egyáltalán nem fejeződik ki, míg az azonos D1:2 fehérjét kódoló másik két

gén a *psbAII* és a *psbAIII* a nevelési körülményektől függően különböző mértékben expresszálódik. Ezzel szemben *Synechococcusban* a *psbAI* is kifejeződik, de a transzkripció sebessége a nevelő fény intenzitásának függvényében a *psbAII/III* génekével ellentétesen változik. *Chlamydothrys stellata* algához rendszertanilag közelebb álló borsón a miénkhez hasonló eredményre jutottak Pfannschmidt és mtsai. (1999) is. Borsó növényekben a PS II és PS I kiegyenlítetlen megvilágítása következtében fellépő redukció gátolja a *psbA* gén transzkripcióját. Az intermedier elektrontranszport komponensek redox állapotának hatását a PS II felépítésében résztvevő más fehérjék génjeire már kimutatták. A sejtmagban kódolt *cab* gének, a PS II klorofill tartalmú fénybegyűjtő antenna komplex fehérjék génjeinek expressziója csökkent, ha a PQ erős fénnel történő megvilágítás hatására redukálódott (Escoubas és mtsai., 1995). Wolf és mtsai. megállapították, hogy az általunk is tanulmányozott *Chlamydothrys stellata cab* génjei CO<sub>2</sub> mentes körülmények között kevésbé fejeződnek ki. A fent említett irodalmi és saját eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a fényviszonyokhoz és az acetát metabolizmus követelményeihez való alkalmazkodás hátterében egy közös, redox kontrollon alapuló szabályozó mechanizmus húzódik meg. Mind a fotoszisztémák egyenlőtlen gerjesztése, mind az acetát metabolizmus által előidézett elektron beáramlás a PQ vagy a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex redukciójával jár. A redukció a génexpresszióra hatva csökkenti a PS II szintézisét egy olyan alacsonyabb PS II/PS I arányt eredményezve, amely visszaállítja az elektrontranszport egyensúlyát. Az intermedier elektrontranszport komponensek oxidációja (alacsony fényintenzitás, PS I fény, fotoheterotróf-autotróf átmenet) viszont növeli a PS II gének átírását és a PS II/PS I arányt, míg az egyensúly megint helyre nem áll. Mivel a DBMIB megakadályozza az acetát gátló hatását a *psbA* transzkripciójára, valószínűsíthető hogy a state 1/state 2 átmenethez hasonlóan a

redox szenzor itt is a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex. Pfannschmidt és mtsai. (1999) ezzel szemben azt találta, hogy a DBMIB, amely akadályozza a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex redukcióját, miközben elősegíti a PQ redukcióját, fokozza a PS II fénynek a *psbA* transzkripcióra gyakorolt gátló hatását. Az általunk használt 3-5  $\mu$ M koncentrációban a DBMIB a redukált plasztokinon bekötődését akadályozza a citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex Q<sub>o</sub> kötőhelyére. A citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex indítja el a *psbA* transzkripció gátlásához vezető jelátviteli folyamatot, azonban *in vivo* körülmények között a PQ az a mediátor, amely közvetíti a kloroplasztisz redox állapotát a redox szenzorhoz.

Sippola és Aro (1999) kimutatta hogy *Synechococcus* kéalgában a *psbAII/III* transzkript szint befolyásolható tiol csoportokat redukáló vagy oxidáló kémiai anyagokkal, ami arra utal hogy a jelátviteli folyamatban tiol csoportok vesznek részt. A fotoszintetikus elektrontranszport specifikus transzkripció faktorok tiol csoportjait redukálhatja a ferredoxin/tioredoxin rendszeren keresztül. A ferredoxin/tioredoxin rendszeren keresztüli jelátvitel a *psbAII/III* transzkript felhalmozódásához vezet a *psbAI* transzkript mennyiségének egyidejű csökkenésével, ami a D1 fehérje két formája (D1:1 és D1:2) arányának megváltozását eredményezi, de a két forma összege azonos marad. Méréseink szerint a PS I/PS II sztöichiometria megváltozásához a *Chlamydomonas stellata*ban a PS II mennyiségének megváltozása szükséges, hasonlóan a magasabbrendű növényekhez (Pfannschmidt és mtsai., 1999) így elképzelhető hogy a PQ/citokróm*b<sub>6</sub>f* komplex által és a ferredoxin/tioredoxin redox rendszer által szabályozott génexpresszió változások egymástól független adaptációs válaszreakciókat képviselnek. Az ellentmondások teljes tisztázása és a redox szenzor azonosítása a PS I/PS II sztöichiometria meghatározásában további vizsgálatokat igényel.

A state átmenetekhez hasonlóan a két fotokémiai rendszer sztöichiometriájának



redox kontrollja valószínűleg általános mechanizmus, amely más metabolikus folyamatokhoz ill. stresszkörülményekhez való alkalmazkodásban is szerepet játszik. Ezt az általánosítást próbáltuk meg alátámasztani egy másik zöldalgán, *Chlorella vulgaris*on sóstressz alkalmazásával. A 0,5 M NaCl hatására a *Chlorellán* a *Chlamydothrys stellata* autotróf-fotoheterotróf átmenete során tapasztalható jelenségeket sikerült megfigyelni. A fluoreszcencia indukció a PQ redukcióját mutatja, amit a gyors (state 1/state 2), majd a lassú (PS II degradáció) fluoreszcencia kioltás követ. Az ATP tartalom gyors csökkenése is megfigyelhető. Bár a génexpresszió redox regulációja a két fotokémiai rendszer működésének összehangolására általános szabályozó mechanizmusnak tűnik, más tényezők is szerepet játszhatnak a PS I/PS II sztöichiometria kialakításában. Alfonso és mtsai. (2000) *Synechocystis* cianobaktériumban vizsgálták a *psbA* gén transzkripcióját a fotoszintetikus elektrontranszport különböző redox állapotai mellett. A citokróm *b<sub>6</sub>f* komplex redukcióját okozó körülmények között a *psbA* gén transzkripciója és stabilitása olyan módon változott, hogy az a transzkript szint emelkedését és nem csökkenését okozta. Ez a Pfannschmidt és mtsai. (1999) által közölt ill. az általunk kapott eredményekkel ellentétes megállapítás arra utal, hogy a redox állapot mellett egyéb tényezők is befolyásolják a fotoszintetikus gének expresszióját. A fent említett munkában a redukzív körülményeket sötét/fény átmenettel ill. kémiai redukcióval érték el. Ezen körülmények között, a szerzők saját vizsgálatai alapján, a sejt ATP koncentrációja nem változott, ellentétben az acetát metabolizmussal, ahol a redukciót az ATP szint nagymértékű esése kíséri. A PS I/PS II arány szabályozása sok közös vonást mutat a state átmenetekkel. Elképzelhető, hogy a jelátvitel kezdeti szakasza közös a két folyamatban. Allen és mtsai. (1981) megfigyelték hogy a state 1/state 2 átmenet sötétben kémiai redukcióval kiválthatók. A redukció hatása két részből

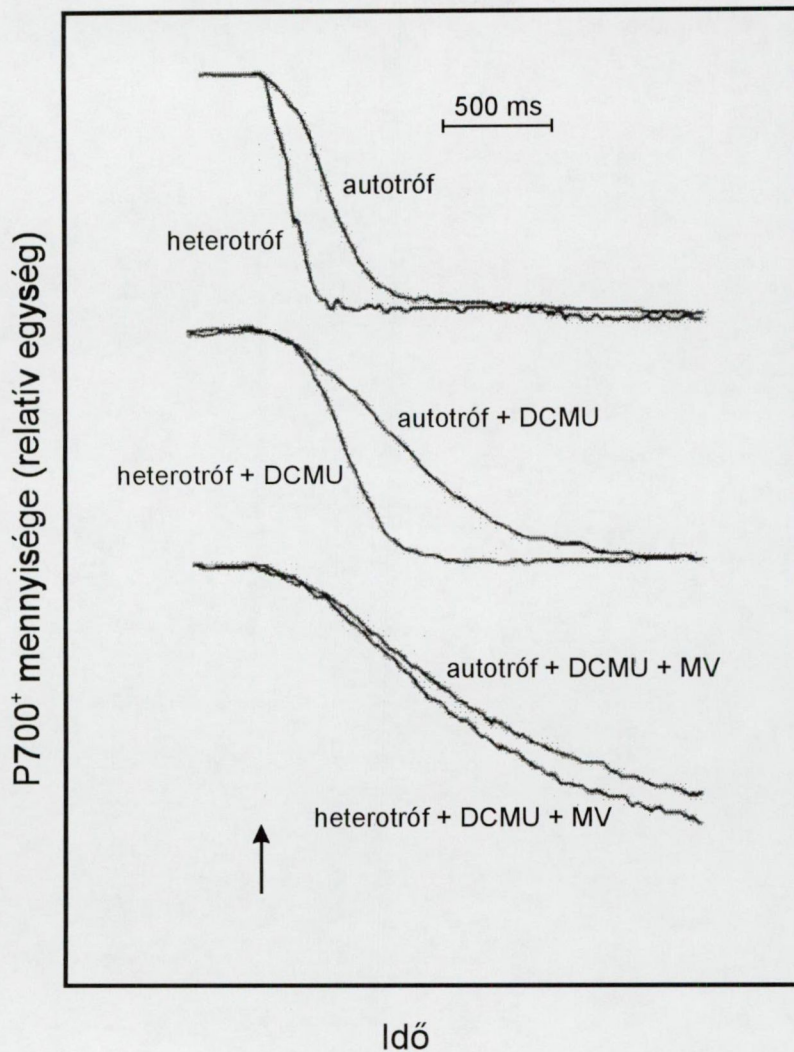
tevődik össze, melyek közül az egyik csak ATP jelenlétében játszódik le. Danon és Mayfield (1994a) kimutatta, hogy *Chlamydomonasban* a sötét/fény átmenetnek a *psbA*, redukált ferredoxinon keresztüli transzlációját serkentő hatása magas ADP koncentráció jelenlétében gátlódik. Az elektrontranszport komponensek redox állapota valószínűleg egy soklépéses kináz kaszkádon keresztül jut el a génexpressziót szabályozó fehérje komponensekre. Az ATP ill. ADP koncentráció megváltozása a foszfoproteinek foszforilációs mintázatát befolyásolva, az elágazó jelátviteli utat eltérő irányba terelheti, ezzel modulálva a redox hatásokat. Az ATP mellett a redukált piridin nukleotidokról is feltételezhető, hogy a redox státusz meghatározásán túl, inhibitorként vagy aktivátorként közvetlenül is befolyásolhatják a génexpressziót (Melis és mtsai., 1985; Pearson és mtsai., 1993).

### **A state 1/state 2 átmenet és a megnövekedett PS I/PS II arány növeli a ciklikus fotofoszforiláció kapacitását**

A *Chlamydomonas* *stellata* az acetátot a glioxilsav-cikluson keresztül asszimilálja. A glioxilsav-ciklus az aktív acetát szintézise miatt fokozott ATP felhasználást jelent a redukáló erők termelésének igénye nélkül. Ilyen körülmények között a ciklikus fotofoszforiláció, amely lehetővé teszi az ATP termelést NADPH előállítás nélkül is, kedvezőbb a sejt számára. A ciklikus elektrontranszport működése azonban a PQ kellően oxidált állapotát teszi szükségessé. A lineáris és ciklikus elektrontranszport versengenek a PQ molekuláért, ezért a PQ PS II általi fotoredukciója (az acetát metabolizmus következtében kialakuló elektronbeáramlással együtt) megbontja a két fotokémiai rendszer egyensúlyát. A redukcióra adott gyors válaszként kialakuló és az LHC II foszforilációjával együttjáró state 1/state 2 átmenet csökkenti a PS II

látszólagos abszorpciós hatáskeresztmetszetét ill. hosszabb távon a PS II gének expressziójának gátlása a feleslegessé váló PS II mennyiségét csökkenti. Mindezek a változások lehetővé teszik a ciklikus elektrontranszport működését. Az első fotokémiai rendszer számának kismértékű növekedése és az elnyelt fényenergiából való nagyobb arányú részesedése még tovább növeli a ciklikus fotofoszforiláció kapacitását.

*Chlamydomonas stellataban* a PS I által hajtott ciklikus elektrontranszport működésére utal az acetát fotoasszimiláció kvantumhatásfokának növekedése a 680 nm-nél hosszabb hullámhossztartományban (Wiessner, 1965). A PS I ciklikus elektrontranszport alátámasztására megmértük a P700 fotooxidációját követő sötét redukciójának kinetikáját. A P700 redoxváltásait abszorpció változás mérésekkel követtük nyomon (27. ábra). A megvilágítás hatására oxidálódó P700 sötétben a lineáris ill. a ciklikus elektrontranszport (esetleg a ciklikus elektrontranszporttal részben közös reakcióutat tartalmazó klororespiráció) segítségével redukálódhat újra. A fotoheterotróf algában a P700<sup>+</sup> redukciója gyorsabb mint az autotróf algában. Ez a különbség DCMU jelenlétében, amely kiküszöböli a lineáris elektrontranszport hozzájárulását a P700<sup>+</sup> redukciójához, még tovább nő. Az autotróf algában a redukció sebessége jelentősen lelassul a DCMU hatására. A metil-viologén (MV), amely megszünteti a ciklikus elektrontranszportot, és a DCMU együttes hatására már nem kapunk további jelentős lassulást. Ebből arra következtethetünk, hogy az autotróf algában a P700<sup>+</sup> redukciója túlnyomó részben a DCMU szenzitív lineáris elektrontranszportnak köszönhető és a ciklikus elektrontranszport hozzájárulása elenyésző. A fotoheterotróf módon nevelt algában a helyzet viszont fordított. A DCMU által okozott lassulás kisebb mértékű, a DCMU jelenlétében mérhető redukció viszont MV hatására lelassul. A DCMU és MV egyidejű jelenlétében mérve már nincs



27. ábra. Fotooxidált P700 sötét redukciójának kinetikája autotróf és 16 órás ftoheterotróf *Chlamydomobrya stellata* tilakoid membránban. A feltüntetett helyeken 10 μM DCMU-t ill. 5 mM MV-t adtunk a mérés előtt. A mérés előtt a mintákat 20 s-ig világítottuk, majd a mérés kezdetekor a fényt a ↑-lal jelzett időpontban kikapcsoltuk.

számontevő különbség az autotróf és ftoheterotróf minták redukciós kinetikája között. A kétféle minta eltérő érzékenysége a DCMU és MV kezelésre azt jelenti, hogy a ftoheterotróf algában a MV szenzitív ciklikus elektrontranszport sokkal nagyobb arányban vesz részt a P700<sup>+</sup> redukciójában mint az autotróf algában.

Több szerző kétségbe vonja a ciklikus elektrontranszportnak az ATP/NADPH arány kialakításában játszott *in vivo* szerepét, és mint a redox egyensúly fenntartásának és a

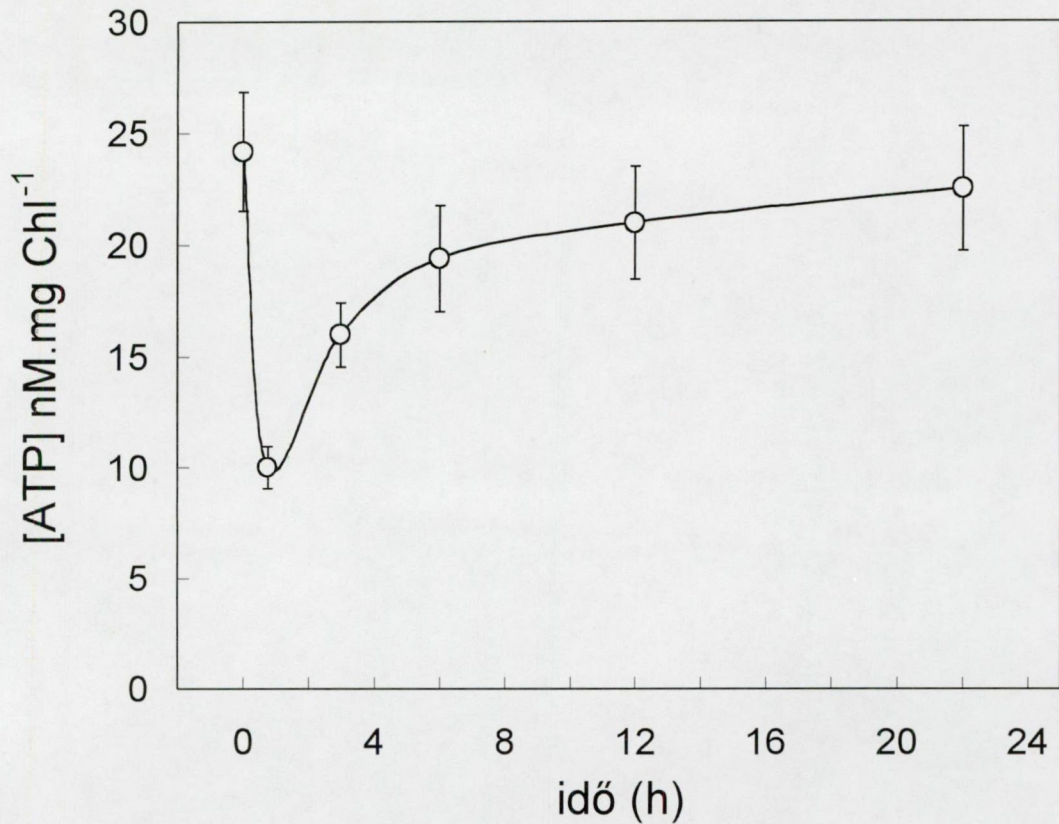


PS II aktivitás szabályozásának egyik lehetséges eszközeként, inkább a stresszhatások elleni védekezésben tulajdonítanak neki jelentőséget (Heber és Walker, 1992). A ciklikus elektrontranszport megnöveli a pH grádienszt a tilakoid membrán két oldala között. A pH csökkenése a tilakoid lumenében fokozza a PS II hődisszipációját (Weiss és Berry, 1987; Demmig és mtsai., 1988), ami csökkenti a primer töltésszétválasztás gyakoriságát a PS II reakciócentrumában. Bár ez utóbbi felfogás nem mond ellent a ciklikus elektrontranszport jelenlétének a fotoheterotróf algában sem, megvizsgáltuk hogy a ciklikus elektrontranszportnak a lineárishoz viszonyított arányának megnövekedése együtt jár-e a fotofoszfórilációs kapacitás fokozódásával. Összehasonlítottuk az ATP képződés sebességét az autotróf és fotoheterotróf algában KCN és DCMU jelenlétében megvilágítás hatására. Ezen körülmények között ATP képződése csak a ciklikus fotofoszfórilációnak tulajdonítható. A fotoheterotróf algában megvilágítás közben az ATP képződés sebessége kb. 1,6-szer gyorsabb volt mint az autotróf algában (5. táblázat).

5. táblázat. Autotróf és 12 órán át fotoheterotróf módon nevelt *Chlamydomonas stellata* ciklikus fotofoszfórilációs kapacitása. Az oxidatív foszfórilációt 0,1 mM KCN, a lineáris elektrontranszportot 10  $\mu$ M DCMU adásával gátoltuk. A mintákat megvilágítás előtt 3 percig sötétben tartottuk.

	Autotróf	Fotoheterotróf
Ciklikus fotofoszfóriláció sebessége (nM ATP/mg klorofil/s)	0,62 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,15
ATP koncentráció 5 min megvilágítás után (nM/mg klorofil)	74 $\pm$ 6,8	63 $\pm$ 5,2

Annak igazolására, hogy a megnövekedett ciklikus fotofoszfóriláció képes a sejt foszfórilációs potenciálját megnövelni, megmértük az algasejtek ATP koncentrációjának időbeli változását az autotróf-fotoheterotróf átmenet során. A 28. ábrán jól látszik az ATP szint korábban már tárgyalt (3. táblázat) gyors csökkenése.



28. ábra. *Chlamydomonas stellata* ATP tartalmának változása az autotróf-fotoheterotróf átmenet alatt. A mérési pontok négy mérés átlagát képezik.

Hosszabb időtartományban azonban az ATP koncentrációja újra emelkedik, kezdetben gyorsan, majd lassabb ütemben. A sejtek ATP tartalmának a csaknem teljes visszaállása bizonyítja, hogy a state 1/state 2 átmenet és a PS I/PS II arány megnövekedése következtében kialakuló, fokozott ciklikus fotofoszfóriláció *in vivo* képes biztosítani az acetát metabolizmus által megkövetelt ATP szintet.

## Összefoglalás

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy az acetát metabolizmusra való áttérés milyen hatást gyakorol a fotoszintetikus elektrontranszportra, az elnyelt fényenergiának a két fotokémiai rendszer közötti megoszlására és a két fotokémiai rendszer mennyiségi arányára *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában. Tanulmányoztuk a ciklikus elektrontranszport és ciklikus fotofoszforiláció *in vivo* szerepét a metabolikus adaptációban. Vizsgálataink során a következő fő eredményeket értük el:

1. Megállapítottuk, hogy fotoheterotróf körülmények hatására a sejtek ATP tartalma átmenetileg lecsökken, míg NADPH koncentrációja megnövekszik. A megnövekedett NADPH tartalom és a lineáris elektrontranszport együttes hatására a két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő elektrontranszport komponensek redukálódnak.
2. A két fotokémiai rendszer közötti elektrontranszport komponensek redukált állapota az LHC II foszforilációját okozza és state 1/state 2 átmenetet vált ki. A state 1/state 2 átmenet csökkenti a PS II látszólagos abszorpciós hatáskeresztmetszetét és a PS II által a reakciócentrumba továbbított fényenergia mennyiségét, csökkentve ezáltal a köztes elektrontranszport komponensek redukáltságát.
3. Az acetát metabolizmus hosszabb időtartományban reverzibilis módon növeli a PS I/PS II arányt a PS II mennyiségének drasztikus csökkentése és a PS I kisebb mértékű növelése következtében.
4. A fotoszintetikus fehérjekomplexek mennyiségi változása a megváltozott génexpresszió következménye. Az acetát metabolizmus csökkenti a *psbA*

transzkript mennyiségét, és kis mértékben növeli a *psaA* transzkript mennyiségét a transzkripció sebességek változásának köszönhetően.

5. A *psbA* gén transzkripciója redox kontroll alatt áll. Az elektrontranszportot különböző helyeken gátló herbicidek alkalmazásával megállapítottuk, hogy az autotróf-fotoheterotróf átmenet során a *psbA* gén transzkripciójának sebességét az elektrontranszportlánc PS I és PS II közötti komponenseinek redukciója csökkenti.
6. Mind a state 1/state 2 átmenet, mind a *psbA* gén transzkripciójának redox kontrolljáért valószínűleg a citokróm *b<sub>c</sub>/f* komplex redox állapota a felelős.
7. A gyors state 1/state 2 átmenet és a lassúbb PS I/PS II arány növekedése helyreállítja a két fotokémiai rendszer egyensúlyát. A PS II aktivitásának csökkenése lehetővé teszi a PS I által katalizált ciklikus elektrontranszportot és ciklikus fotofoszfórilációt. A PS I mennyiségének növekedése és a state 1/state 2 átmenet miatt az elnyelt fényenergiából való nagyobb arányú részesedése következtében tovább nő a ciklikus fotofoszfóriláció kapacitása olyan mértékben, hogy az képes kielégíteni az acetát metabolizmus ATP igényét a NADPH szintjének további emelkedése nélkül is. Megfigyeléseink igazolják, hogy a ciklikus elektrontranszport *in vivo* is szerepet játszik a NADPH/ATP arány szabályozásában.

Méréseinkkel, egy teljesen független módon megerősítettük Allen (1995) azon hipotézisét, miszerint a PS I/PS II sztöichiometria a transzkripció szintjén redox reguláció alatt áll. Továbbá, méréseink hozzásegítenek ahhoz az általánosításhoz, hogy a redox szabályozott molekuláris folyamatok, a state átmenetek és a PS I/PS II sztöichiometria dinamikus, reverzibilis változásai, a fényviszonyokhoz való alkalmazkodáson túl, szerepet játszanak minden olyan adaptációban, amely a két



fotokémiai rendszer egyensúlyának felbomlásához és ezáltal az elektrontranszport komponensek túlzott mértékű redukciójához vagy oxidációjához vezetnek.

## Summary

Life on earth is based on photosynthesis. The production of atmospheric oxygen and the world carbon fixation greatly depends on the rate of this process. The efficiency of photosynthesis is determined by a coordinated interaction of two photosystems connected with an electron transport chain via the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex. Photosystem II is involved in oxygen evolution and transfers electrons from water to plastoquinone. The absorbed light energy of photosystem I drives electron transport from plastoquinone via the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex to NADP<sup>+</sup>. The quantum yield of photosynthesis is close to the theoretical maximum in many plant and alga species independently of the environmental light climate. This is especially surprising because spectroscopically different pigments absorb light for PS I and PS II. Moreover, marked alterations occur not only in light quality and intensity but light also varies over different time scales from short sunflecks to seasonal variations. Even at constant irradiance and spectral composition of light the metabolic requirement of ATP and NADPH may vary according to changes in the nutrition resources and external environmental constraints. Photosynthetic organisms are able to regulate the proportion of linear electron transport from water to NADP<sup>+</sup> generating both ATP and NADPH and PS I cyclic electron transport coupled to enhanced ATP production. An increase in ATP demand and in PS I cyclic phosphorylation would require redistribution of absorbed light energy in favour of PS I at the expense of PS II. The question arises as to how plants and algae can perform photosynthesis with maximal efficiency under a variety of contrasting light conditions and how they can optimise the ratio of linear and cyclic electron transport to satisfy the requirement of ATP and NADPH production. Evidences have been accumulated that the organization and function of thylakoid membrane and photosynthetic apparatus are not static but highly

dynamic in nature (Allen et al., 1981; Fujita et al., 1987; Kim et al., 1993). The photosynthetic organisms have evolved molecular mechanisms which can balance energy distribution between the two photosystems so as to maximize the efficiency of light-harvesting (Chow et al., 1990) and to optimize the ratio of ATP and NADPH (Horton, 1985; Bulté et al., 1990) in response to fluctuations in environmental conditions. Nature evolved two mechanisms to regulate energy distribution between the two photosystems and to satisfy the ATP/NADPH requirement:

(1) There are short-term adaptive changes (seconds to minutes) resulting from rearrangement of already existing membrane components which modify reversibly only the composition of the photosynthetic membrane (Allen et al., 1981; Bulté et al., 1990). With overexcitation of PS II relative to PS I, the intersystem electron carriers (cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex and plastoquinone) become reduced which activates a thylakoid protein kinase. The activated kinase reversibly phosphorylates a mobile peripheral part of the light-harvesting chlorophyll protein complex of PS II (LHC II). The phosphorylated LHC II detaches from PS II decreasing the absorption cross-section and activity of PS II (state 1/state 2 transition). It is also suggested that the phosphorylated LHC II migrates to PS I centers and enhances its activity.

(2) Chloroplasts possess another dynamic strategy to cope with the longer fluctuations in the environment (Glick et al., 1986; Fujita et al., 1987; Kim et al., 1993). These long-term (hours to days) regulatory changes involve synthesis and degradation of thylakoid components and alter the structure of the photosynthetic membrane with the adjustment of LHC II and LHC I antenna size as well as PS I/PS II stoichiometry.

Several authors (Anderson, 1992; Murakami and Fujita, 1993; Allen, 1995) have proposed that both state transitions and PS I/PS II ratio adjustment are responses

to perturbations of the redox state of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex or plastoquinone pool and involve regulation of the *de novo* PS I and PS II protein synthesis, assembly and breakdown. The mechanism of adjustment of photosystem stoichiometry is unknown, but is probably associated with redox regulation of gene expression (Escoubas et al., 1995; Allen, 1995; Maxwell et al., 1995).

On the basis of observations and ideas published in the literature (Melis et al., 1985; Allen, 1995; Anderson et al., 1995) we have put forward the following hypothesis:

Beside the changes of the light regime, the changes in the plant cell metabolism depending on the photosynthetic production of ATP and reducing power (and any other environmental or internal change i.e. light quality and intensity, temperature, nutrient availability, stress effects), which disturbs the equilibrium between the efflux of electrons from PS II and influx of electrons to PS I, modulates the redox state of cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex and PQ interconnecting the two photosystems. In turn, the redox state of cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex and/or plastoquinone, which reflects the redox poise of the intersystem electron transport, will selectively regulate at transcriptional level the expression of chloroplast and nuclear *cab* gene via a redox signalling pathway which ultimately affects the structure and function of the photosynthetic apparatus. In view of the functional similarities between state transitions and photosystems stoichiometry adjustment, it is possible that these processes share the initial redox sensory component (cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex or PQ) and other initial steps of a subsequently branching signal transduction pathway.

This integrated feedback regulatory mechanism may serve to optimize the distribution of absorbed light energy between the two photosystems and to satisfy the



ATP/NADPH requirement ratio of metabolic processes by changing the PS I/PS II stoichiometry.

The aim of our investigation was to determine the validity of the above hypothesis for autotrophic to photoheterotrophic transition of the green alga, *Chlamydomobrya stellata*. This alga proved to be a suitable organism for this purpose. Under autotrophic conditions, the *Chlamydomobrya stellata* favours a linear electron transport and assimilates CO<sub>2</sub> in the Calvin cycle. Under photoheterotrophic conditions, it can live on acetate. Acetate is assimilated into carbohydrates via the glyoxylate cycle in co-operation with gluconeogenesis. The ratio of ATP/NAD(P)H requirement is higher with acetate metabolism than for CO<sub>2</sub> fixation in the Calvin cycle. Therefore, we expected that adaptation of the alga to acetate metabolism would be accompanied with accumulation of reducing equivalents which can keep the inter-photosystem electron transport chain permanently in a reduced state and results in a state 1/state 2 transition and in long-term, in an increase in the PS I/PS II stoichiometric ratio.

We have observed that acetate assimilation in the glyoxylate cycle resulted in a large decrease in the ATP content and a concomitant increase in the NADPH content of the *Chlamydomobrya stellata* alga cells. Due to the ATP shortage, the activity of Calvin cycle is retarded and the NADPH produced at the acceptor side of PS I is not used in the CO<sub>2</sub> reduction. The accumulated NADPH can reduce the inter-photosystem components via a ferredoxin-plastoquinone reductase and/or a NADPH dehydrogenase (Bendall and Manasse, 1995; Endo and Asada, 1996). Since the electron transport chain is blocked both at the acceptor side of PS I and between PS I and PS II under photoheterotrophic conditions, the PS II driven electron transport to PQ pool has a considerable contribution to the reduction of the inter-photosystem

components. The combined effect of high NADPH concentration and linear electron transport brings about an over-reduction of the inter-photosystem electron transport components as shown by the  $F_i$  and  $F_o$  rise in room temperature fluorescence induction, the replacement of the thermoluminescence B band with the Q band and by the inhibition of linear electron transport rate.

The kinetics of the influx of electrons into the inter-photosystem electron transport chain were measured by light-induced absorbance change measurement of cytochrome  $f$ . The accelerated rate of dark reduction of the photo-oxidised cytochrome  $f^+$ , even in the presence of DCMU and the deceleration of the reduction of cytochrome  $f^+$  by DBMIB shows that electrons reach the cytochrome  $f$  mainly via PQ pool.

The reduced state of the inter-photosystem electron transport components initiated a state 1/state 2 transition, as shown by a decreased  $F_m$  in room temperature fluorescence induction and rapid quenching of PS II associated low temperature (77K) fluorescence emission bands. We could observe the enhanced phosphorylation of LHC II during autotrophic-photoheterotrophic transition.

Inhibitors of the photosynthetic electron transport, DCMU and DBMIB, eased the effects of acetate metabolism on the room temperature fluorescence induction and on the 77 K fluorescence emission and decreased the extent of state 1/state 2 transition indicating that the redox state of the inter-photosystem components governs the state transitions. Since DCMU partially and DBMIB almost completely could prevent the state 1/state 2 transition, we can conclude that a component behind or at the inhibitory side of DBMIB (the  $Q_o$  binding site of the cytochrome  $b_6/f$  complex) controls the short-term adaptation.

The adaptation of the photosynthetic apparatus to acetate metabolism manifested itself in long-term changes as well. We found that after 12 h photoheterotrophic cultivation, the amplitude of the PS II peak in 77 K fluorescence decreased to one fifth. At the same time, the PS I band increased 1.4 times. In addition, our cytochrome *b<sub>559</sub>* and P700 concentration measurements showed a decrease in the number of PS II reaction centers and a simultaneous increase in the abundance of PS I reaction centers, respectively. Calculated from the changes of the amount of the reaction centers, the PS II/PS I ratio shifted from 1.25 to 0.31 during the autotrophic to photoheterotrophic transition. The changes in the photosystem ratio were due to the decrease of the PS II rather than to the increase in the amount of PS I. The photosystem stoichiometry adjustment was also monitored by following the changes in the amount of PS II constituent proteins, *PsbA* and *PsbB*, as well as the main PS I protein, *PsaA* using SDS-PAGE and immunoblot analysis with specific polyclonal antibodies. Photoheterotrophic growth, which resulted in the reduction of the inter-photosystem electron transport chain, drastically decreased the amount of *PsbA* and *PsbB* proteins and increased slightly that of *PsaA* protein.

We investigated the effect of acetate metabolism on the expression of the *psbA* and *psaA* genes. The transcript level of *psbA* was gradually lowered while the abundance of the *psaA* mRNA slightly increased. After 16 h of photoheterotrophic cultivation, the *psbA* amount decreased to 25 % and the *psaA* concentration rose with about 10 %.

A change in the *psbA* steady-state mRNA level might result from a change in the transcript level, and/or from a change of the rate of transcription. In order to answer this question, we determined the half-times of the *psbA* mRNA both in the autotrophic and heterotrophic cells in the presence of actinomycin D, an inhibitor of

transcription initiation. The stability of the *psbA* transcript was not different in the two kinds of cells. From the stability measurements, we concluded that the changes in the steady-state *psaA* transcript level were caused by changes in the rate of transcription.

In the heterotrophic alga, the amount of *psbA* mRNA was almost preserved at the acetate-free autotrophic level if DBMIB was added to the cultivation medium. Similarly, the amount of PsbA and PsbB protein remained almost at the same level as in the autotrophic alga when the photoheterotrophic alga was cultivated in the presence of DBMIB. These observations indicate that the transcription of the *psbA* is redox regulated. Since DBMIB facilitates the accumulation of electrons in the plastoquinone pool and inhibit the plastoquinol binding in the  $Q_o$  pocket in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, we can assume that the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex is the site of the redox control in the regulation of the *psbA* gene expression.

Considering that the acetate metabolism in the glyoxylate cycle with high ATP/NADPH ratio requirement would favour a PS I driven cyclic electron transport, we supposed that both the state 1/state 2 transition and the long-term increase in the PS I/PS II ratio during the conversion from CO<sub>2</sub> to acetate metabolism serve to provide the necessary redox poise to a more efficient cyclic PS I electron transport and coupled photophosphorylation to supply the cells with ATP required for acetate metabolism.

To elucidate the role of the PS I cycle in the cell adaptation to acetate metabolism, we compared the rate of PS I driven cyclic electron transport and photophosphorylation in autotrophically and photoheterotrophically cultivated cells. The rate of the PS I cycle was measured by monitoring the P700 redox changes during and after illumination. The post-illumination re-reduction kinetics of P700<sup>+</sup> was stimulated by heterotrophic cultivation in the presence of 20 mM acetate. In the



presence of DCMU the dark reduction of  $P700^+$  slowed down in autotrophic cells because electron donation from PS II was inhibited. Acetate metabolism accelerated the decay kinetics even in presence of DCMU suggesting electron input to the donor side of the PS I via plastoquinone pool. MV, which abolishes the ferredoxin pathway of PS I cycle, significantly depressed the dark reduction rate of the DCMU treated photoheterotrophic alga cells. The effects of DCMU and MV indicate that the DCMU insensitive PS I cycle has a larger contribution to the  $P700$  reduction in photoheterotrophic alga compared to the autotrophic alga.

To examine the question whether the increased PS I cyclic electron transport rate is coupled to enhanced ATP production, the rate of cyclic photophosphorylation was measured both in autotrophic and photoheterotrophic alga. We observed that the rate of ATP production under conditions that allow only cyclic photophosphorylation (the linear electron transport and oxidative phosphorylation were eliminated by 0.1 mM KCN and 10  $\mu$ M DCMU addition, respectively) was faster in the heterotrophic alga (0.62 nM/mgChl/s) than in the autotrophic alga (0.98 nM/mgChl/s) indicating an enhanced PS I cyclic phosphorylation capacity induced by the increased ATP demand of acetate metabolism.

Due to the enhanced cyclic photophosphorylation capacity the ATP concentration could reach almost the original autotrophic level after the transient decrease following the acetate addition proving the *in vivo* ATP-supplying role of cyclic photophosphorylation in metabolic adaptation.

## Idézett irodalom

- Aizawa, K. & Fujita, Y. (1997). Regulation of synthesis of PSI in the cyanophytes *Synechocystis* PCC6714 and *Plectonema boryanum* during the acclimation of the photosystem stoichiometry to the light quality. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 319-326.
- Aizawa, K., Shimizu, T., Hiyama, T., Satoh, K., Nakamura, H., & Fujita, Y. (1992). Changes in composition of membrane proteins accompanying the regulation of PS I/PS II stoichiometry observed with *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth. Res.*, **32**, 131-138.
- Alfonso, M., Perewoska I., & Kirilovsky, D. (2000). Redox control of *psbA* gene expression in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex. *Plant Physiol.*, **122**, 505-515.
- Allen, J.F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 275-335.
- Allen, J.F. (1995). Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol. Plant.*, **93**, 196-205.
- Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E., & Arntzen, C.J. (1981). Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, **291**, 25-29.
- Allen, J.F. & Melis, A. (1988). The rate of P-700 photooxidation under continuous illumination is independent of State 1-State 2 transitions in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **933**, 95-106.
- Anderson, J.M. (1992). Cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynth. Res.*, **34**, 341-357.
- Anderson, J.M., Chow, W., & Park, Y.-I. (1995). The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.*, **46**, 129-139.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- Arnon, D.I. (1959). Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature*, **184**, 10-21.
- Arnon, D.I. (1991). Photosynthetic electron transport: Emergence of a concept, 1949-59. *Photosynth. Res.*, **29**, 117-131.
- Bald, D., Kruip, J., Boekema, E.J., & Rogner, M. (1992). Structural investigation cyt *b<sub>6</sub>/f*-complex and PS I-complex from cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. In: N. Murata (Ed.), *Photosynthesis, Vol I* (pp. 629-632). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Bedell, G.W. & Govindjee (1973). Photophosphorylation in intact algae: Effects of inhibitors, intensity of light, electron acceptor and donors. *Plant Cell Physiol.*, **14**, 1081-1097.
- Bendall, D.S. & Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 23-38.

- Bennett, J. (1979). The protein kinase of the thylakoid membrane is light-dependent. *FEBS Lett*, **103**, 342-344.
- Bennett, J. (1980). Evidence for thylakoid-bound protein phosphoprotein phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 85-89.
- Bennett, J. (1991). Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 281-311.
- Bennett, J., Shaw, E.K., & Michel, H. (1988). Cytochrom *b<sub>6</sub>f* complex is required for phosphorylation of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex II in chloroplast photosynthetic membranes. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 95-100.
- Bennett, J., Steinback, K.E., & Arntzen, C.J. (1980). Chloroplasts phosphoproteins: regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5253-5257.
- Biggins, J., Campbell, C.L., & Bruce, D. (1984). Mechanism of the light state transition in photosynthesis. II. Analysis of the phosphorylated polypeptides in the red alga. *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 138-144.
- Björkman, O. & Demmig, B. (1982) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170**, 489-504.
- Bonaventura, C. & Myers, J. (1969). Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 366-383.
- Brandt, P., Kaiser-Jarry, K., & Wiessner, W. (1982). Chlorophyll-protein complexes. Variability of CPI, and the existence of two distinct forms of LHCP and one low-molecular-weight chlorophyll *a* protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 404-409.
- Brandt, P., Zufall, E., & Wiessner, W. (1983). Relation between the light-harvesting chlorophyll *a*-protein complex LHCP<sub>a</sub> and photosystem I in the alga *Chlamydomonas stellata*. *Plant Physiol.*, **71**, 128-131.
- Bulté, L., Gans, P., Rebéillé, F., & Wollman, F.A. (1990). ATP control on state transition *in vivo* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 72-80.
- Burkey, K.O. (1993). Effect of growth irradiance on plastocyanin levels in barley. *Photosynth. Res.*, **36**, 103-110.
- Canaani, O. (1990). The role of cyclic electron flow around photosystem I and excitation energy distribution between the photosystems upon acclimation to high ionic stress in *Dunaliella*. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 591-599.
- Canaani, O., Barber, J., & Malkin, S. (1984). Evidence that phosphorylation and dephosphorylation regulate the distribution of excitation energy between the two photosystems of photosynthesis *in vivo*: Photoacoustic and fluorimetric study of an intact leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1614-1618.
- Canaani, O., Schuster, G., & Ohad, I. (1989). Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect on state transition, intersystem energy distribution and photosystem I cyclic electron flow. *Photosynth. Res.*, **20**, 129-146.

- Cha, Y. & Mauzerall, D.C. (1992). Energy storage of linear and cyclic electron flows in photosynthesis. *Plant Physiol.*, **100**, 1869-1877.
- Chain, R.K. & Arnon, D.I. (1977). Quantum efficiency of photosynthetic energy conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3377-3381.
- Chow, W. & Hope, A.B. (1987). The stoichiometries of supramolecular complexes in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. *Aust. J. Plant Physiol.*, **14**, 21-28.
- Chow, W., Melis, A., & Anderson, M. (1990). Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7502-7506.
- Chylla, R.A., Garab, G. & Whitmarsh, J. (1987). Evidence for slow turnover in a fraction of photosystem II complexes in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **894**, 562-571.
- Cleland, R.E. & Bendall, D.S. (1992). Photosystem I cyclic electron transport: Measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity. *Photosynth. Res.*, **34**, 409-418.
- Coughlan, S., Kieleczawa, J., & Hind, G. (1988). Further enzymatic characteristics of a thylakoid protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **15**, 16631-16636.
- Cramer, W.A. & Whitmarsh, J. (1977). Photosynthetic cytochromes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 133-172.
- Crofts, A.R. & Wraight, C.A. (1983). The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 149-183.
- Cuello, J., Quiles, M.J., Albacete, M.E., & Sabater, B. (1995). Properties of a large complex with NADH dehydrogenase activity from barley thylakoids. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 265-271.
- Curtis, P.J. & Megard, R.O. (1987). Interactions among irradiance, oxygen evolution in nitrite uptake by *Chlamydomonas* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **23**, 608-613.
- Danon, A. & Mayfield, S.P. (1991). Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.*, **10**, 3993-4001.
- Danon, A. & Mayfield, S.P. (1994a). ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding *in vitro*: implications in light-modulated translation. *EMBO J.*, **19**, 2227-2235.
- Danon, A. & Mayfield, S.P. (1994b). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*, **266**, 1717-1719.
- Delosme, R., Beal, D., & Joliot, P. (1994). Photoacoustic detection of flash-induced charge separation in photosynthetic systems. Spectral dependence of the quantum yield. *Biochim. Biophys. Acta*, **1185**, 56-64.
- Delosme, R., Olive, J., & Wollman, F.A. (1996). Changes in the light energy distribution upon state transition: an *in vivo* photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1273**, 150-158.
- Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., & Czygan, F.C. (1988). Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.*, **87**, 17-24.



- Deng, X. & Gruissem, W. (1987). Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell*, **49**, 379-387.
- Deng, X., Tonkyn, J., Peter, G., Thornber, J., & Gruissem, W. (1989). Post-Transcriptional Control of Plastid mRNA Accumulation during Adaptation of Chloroplasts to Different Light Quality Environments. *The Plant Cell*, **1**, 645-654.
- Deshpande, N.N., Bao, Y., & Herrin, D.L. (1997). Evidence for light/redox-regulated splicing of *psbA* pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA*, **3**, 37-48.
- Diner, B.A. (1977). Dependence of the deactivation reactions of photosystem II on the redox state of plastoquinone pool. A varied under anaerobic conditions. Equilibria on the acceptor side of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 247-258.
- Edwards, G. & Walker, D.A. (1983). *C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Elich, T.D., Edelman, M., & Matoo, A.K. (1997). Evidence for light-dependent and light-independent protein dephosphorylation in chloroplast. *FEBS Lett*, **411**, 236-238.
- Endo, T. & Asada, K. (1996). Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 551-555.
- Endo, T., Mi, H., Shikanai, T., & Asada, K. (1997). Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1272-1277.
- Escoubas, J.-M., Lomas, M., LaRoche, J., & Falkowski, P.G. (1995). Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10237-10241.
- Eskins, K. & Duysen, M. (1984). Chloroplast structure in normal and pigment-deficient soybeans grown in continuous red or far-red light. *Physiol. Plant.*, **61**, 351-356.
- Falkowski, P.G., Owens, T.G., Ley, A.C., & Mauzerall, D.C. (1981). Effect of growth irradiance levels on the ratio of reaction centers in two species of marine phytoplankton. *Plant Physiol.*, **68**, 969-973.
- Fujita, Y. (1976). The C-550 photoresponse at room temperature observed in membrane fragments of the blue-green alga *Anabena variabilis*. *Plant Cell Physiol.*, **17**, 187-191.
- Fujita, Y. & Murakami, A. (1987). Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system: Stoichiometry among photosystem I and II complexes and their light-harvesting antennae and cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1547-1553.
- Fujita, Y., Murakami, A., & Ohki, K. (1987). Regulation of photosystem composition in the cyanobacterial photosynthetic system: The regulation occurs in response to the redox state of electron pool located between the two photosystems. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 283-292.
- Fujita, Y., Murakami, A., Ohki, K., & Hagiwara, N. (1988). Regulation of photosystem composition in cyanobacterial photosynthetic system: Evidence indicating that photosystem I formation is controlled in response to the electron transport state. *Plant Cell Physiol.*, **29**, 557-564.

- Fujita, Y., Ohki, K., & Murakami, A. (1985). Chromatic regulation of photosystem composition in the photosynthetic system of red and blue-green algae. *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1541-1548.
- Gal, A., Schuster, G., Frid, D., Canaani, O., Schwieger, H.G., & Ohad, I. (1988). Role of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex in the redox-controlled activity of *Acetabularia* thylakoid proteine kinase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7785-7791.
- Gans, P. & Rebeille, F. (1990). Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 150-155.
- Garab, G., Rózsa, Zs., & Govindjee (1988). Carbon dioxide affects charge accumulation in leaves. *Z. Naturforsch.*, **75**, 517-519
- Garab, G., Lajko, F., Mustardy, L., & Marton, L. (1989). Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: Evidence for chlororespiration. *Planta*, **179**, 349-358.
- Garewal, H.S. & Wasserman, A.R. (1974). Triton-X-100-4 M ureas as an extraction medium for membrane proteins. I. Purification of chloroplast cytochrome *b<sub>559</sub>*. *Biochemistry*, **13**, 4063-4071.
- Giardi, M.T. (1993). Phosphorylation and disassembly of the photosystem II core as an early stage of photoinhibition. *Planta*, **190**, 107-113.
- Glick, R., McCauley, S., Gruissem, W., & Melis, A. (1986). Light quality regulates expression of chloroplast genes and assembly of photosynthetic membrane complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4287-4291.
- Glick, R., McCauley, S., & Melis, A. (1985). Effect of light quality on chloroplast-membrane organization and function in pea. *Planta*, **164**, 487-494.
- Godde, D. & Trebst, A. (1980). NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.*, **127**, 245-252.
- Govindjee (1992). Bicarbonate-Reversible inhibition of plastoquinone reductase in photosystem II. *Z. Naturforsch.*, **48**, 251-258.
- Gräber, P., Junesch, U., & Thulke, G. (1987). The chloroplast ATP-synthase: the rate of the catalytic reaction. In J. Biggins (Ed.), *Progress in Photosynthesis Research Vol. III*. (pp. 2177-2184). Dordrecht: Martinus Nijhoff.
- Greenbaum, N.L. & Mauzerall, D.C. (1991). Effect of irradiance level on distribution of chlorophylls between PS II and PS I as determined from optical cross-section. *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**, 195-207.
- Haehnel, W. (1976). The ratio of the two light reactions and their coupling in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 499-509.
- Harbinson, J. & Foyer, C.H. (1991). Relationships between the efficiencies of photosystem I and II and stromal redox state in CO<sub>2</sub>-free air. *Plant Physiol.*, **97**, 41-49.
- Havaux, M. (1992). Photoacoustic measurements of cyclic electron flow around photosystem I in leaves adapted to light-states 1 and 2. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 799-803.

- Haworth, P. & Melis, A. (1983). Phosphorylation of chloroplast thylakoid membrane proteins does not increase the absorption cross-section of photosystem I. *FEBS Lett*, **160**, 277-280.
- Heber, U., Gerst, U., Kriger, A., Neimanis, S., & Kobayashi, Y. (1995). Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C3 plants: Does it exist? if so, what is its function? *Photosynth. Res.*, **46**, 269-275.
- Heber, U. & Santarius, K.A. (1965). Compartmentation and reduction of pyridine nucleotides in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 390-408.
- Heber, U. & Walker, D.A. (1992). Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.*, **100**, 1621-1626.
- Hibino, T., Lee, B.H., Rai, A.K., Ishikawa, H., Kojima, H., Tawada, M., Shimoyama, H., & Takabe, T. (1996). Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Aust. J. Plant Physiol.*, **23**, 321-330.
- Hope, A.B., Handley, L., & Matthews, D.B. (1985). Further studies of proton translocation in chloroplasts after single turnover flashes. III. Conditions for the operation of an apparent Q-cycle in thylakoids. *Aust. J. Plant Physiol.*, **12**, 387-394.
- Horton, P. (1985). Interaction between electron transfer and carbon assimilation. In J. Barber & N.R. Baker (Eds.), *Photosynthetic mechanisms and the environment* (pp. 135-187). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Horton, P. & Black, M.T. (1981). Light-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in pea chloroplasts induced by adenosine 5'-triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 53-62.
- Horton, P. & Black, M.T. (1982). On the nature of the fluorescence decrease due to phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 22-27.
- Hosler, J.P. & Yocum, C.F. (1985). Evidence for two cyclic photophosphorylation reactions concurrent with ferredoxin catalysed non-cyclic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **808**, 21-31.
- Hosler, J.P. & Yocum, C.F. (1987). Regulation of cyclic photophosphorylation during ferredoxin-mediated electron transport. *Plant Physiol.*, **83**, 965-969.
- Jeanjean, R., Matthijs, H.C.P., Onana, B., Havaux, M., & Joset, F. (1993). Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 1073-1079.
- Jeanjean, R., van Thor, J.J., Havaux, M., Joset, F., & Matthijs, H.C.P. (1999). Identification of plastoquinone-cytochrome/b<sub>6</sub>f reductase pathways in direct or indirect photosystem I driven cyclic electron flow in *Synechocystis* PCC 6803. In Peschek (Ed.), *The phototrophic procaryotes* (pp. 251-258). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Katona, E., Neimanis, S., Schonknecht, G., & Heber, U. (1992). Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynth. Res.*, **34**, 449-464.

- Kawamura, M., Mimuro, M., & Fujita, Y. (1979). Quantitative relationship between two reaction centers in the photosynthetic system of blue-green algae. *Plant Cell Physiol.*, **20**, 697-705.
- Kim, J., Glick, R., & Melis, A. (1993). Dynamics of Photosystem Stoichiometry Adjustment by Light Quality in Chloroplasts. *Plant Physiol.*, **102**, 181-190.
- Kim, J. & Mayfield, S.P. (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, **278**, 1954-1957.
- Krause, G.H. & Behrend, U. (1983). Characterization of chlorophyll fluorescence quenching in chloroplast by fluorescence spectroscopy at 77 K. II. ATP-dependent quenching. *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 176-181.
- Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Choller, S., Melis, A., & Malkin, R. (1983). Characterization of a resolved oxygen-evolving photosystem II preparation for spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 201-211.
- Leong, T.-Y. & Anderson, M. (1983). Changes in composition and function of thylakoid membranes as a result of photosynthetic adaptation of chloroplasts from pea plants grown under different light conditions. *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 391-399.
- Ley, A.C. & Mauzerall, D.C. (1982) Absolute absorption cross sections for Photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 95-106
- MacDonald, G.M., Boener, R.J., Every, R.M., Cramer, W.A., Debus, R.J., & Barry, B.A. (1994). Comparison of cytochrome *b*-559 contents in photosystem II complexes from spinach and *Synechocystis* species PCC 6803. *Biochemistry*, **33**, 4393-4400.
- Manodori, A. & Melis, A. (1986). Cyanobacterial acclimation to photosystem I or photosystem II light. *Plant Physiol.*, **82**, 185-189.
- Maxwell, D.P., Laudembach, D.E., & Huner, N.P.A. (1995). Redox regulation of light-harvesting complex II and *cab* mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.*, **109**, 787-795.
- Melis, A. (1984). Light regulation of photosynthetic membrane structure, organization and function. *J. Cell Biochem.*, **24**, 271-285.
- Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1058**, 87-106.
- Melis, A. & Brown, J. (1980). Stoichiometry of system I and system II reaction centers and of plastoquinone in different photosynthetic membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4712-4716.
- Melis, A. & Harvey, G. (1981). Regulation of photosystem stoichiometry, Chlorophyll *a* and chlorophyll *b* content and relation to chloroplast ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 138-145.
- Melis, A. & Homann, P. (1976). Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **23**, 343-350.



- Melis, A., Manodori, A., Glick, R., Ghirardi, M., McCauley, S., & Neale, P. (1985). The mechanism of photosynthetic membrane adaptation to environmental stress conditions: a hypothesis on the role of electron-transport capacity and of ATP/NADPH pool in the regulation of thylakoid membrane organization and function. *Physiol. Vég.*, **23**, 757-765.
- Melis, A., Mullineaux, C.W., & Allen, J.F. (1989). Acclimation of the photosynthetic apparatus to photosystem I or photosystem II light: Evidence from quantum yield measurements and fluorescence spectroscopy of cyanobacterial cells. *Z. Naturforsch.*, **44c**, 109-118.
- Melis, A., Murakami, A., Nemson, J.A., Aizawa, K., Ohki, K., & Fujita, Y. (1996). Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* alters photosystem stoichiometry and improves the quantum efficiency of photosynthesis. *Photosynth. Res.*, **47**, 253-265.
- Melis, A. & Thielen, A.P.G.M. (1980). The relative absorption cross-section of photosystem I and photosystem II in chloroplast from three types of *Nicotiana tabacum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 275-286.
- Melis, A. (1990). Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to light stress. *Plant Physiol.*, **93**, 1433-1440.
- Mi, H., Endo, T., Ogawa, T., & Asada, K. (1995). Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 661-668.
- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., & Asada, K. (1992a). Donation of electrons from cytosolic components to the intersystem chain in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 as determined by the reduction of P700<sup>+</sup>. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1099-1105.
- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., & Asada, K. (1992b). Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1233-1237.
- Mullet, J.E. & Klein, R.R. (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.*, **6**, 1511-1579.
- Murakami, A. (1997). Quantitative analysis of 77K fluorescence emission spectra in *Synechocystis* sp. PCC 6714 and *Chlamydomonas reinhardtii* with variable PS I/PS II stoichiometries. *Photosynth. Res.*, **53**, 141-148.
- Murakami, A. & Fujita, Y. (1988). Steady state of photosynthesis in cyanobacterial photosynthetic systems before and after regulation of electron transport composition: Overall rate of photosynthesis and PSI/PSII composition. *Plant Cell Physiol.*, **29**, 305-311.
- Murakami, A. & Fujita, Y. (1991). Regulation of photosystem stoichiometry in the photosynthetic system of the Cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714 in response to light-intensity. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 223-230.
- Murakami, A. & Fujita, Y. (1991). Steady state of photosynthetic electron transport in cells of the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714 having different stoichiometry between PS I and PS II: Analysis of flash-induced oxidation-reduction of cytochrome *f* and P700 under steady state photosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 213-222.

- Murakami, A. & Fujita, Y. (1993). Regulation of stoichiometry between PS I and PS II in response to light regime for photosynthesis observed with *Synechocystis* PCC 6714: Relationship between redox state of cyt *b<sub>6</sub>f* complex and regulation of PS I formation. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 1175-1180.
- Murata, N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light induced change of chlorophyll *a* fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 242-251.
- Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H., & Kuwabara, T. (1984). Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with triton X-100 from spinach chloroplasts. *J. Biochem.*, **89**, 79-86.
- Myers, J., Graham, J., & Wang, R. (1980). Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol.*, **66**, 1144-1149.
- Neale, P. & Melis, A. (1986). Algal photosynthetic membrane complexes and the photosynthesis-irradiance curve: A comparison of light-adaptation responses in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **22**, 531-538.
- Ogawa, T., Miyano, A., & Inoue, Y. (1985). Photosystem I-driven inorganic carbon transport in the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **808**, 77-84.
- Pearson, C.K., Wilson, S.B., Schaffer, R., & Ross, A.W. (1993). NAD turnover and utilisation of metabolites for RNA synthesis in a reaction sensing the redox state of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex in isolated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 397-404.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., & Allen, J.F. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, **397**, 625-628.
- Portis, A.R. & McCarty, R.E. (1976). Quantitative Relationships between Phosphorylation, Electron Flow, and Internal Hydrogen Ion Concentration in Spinach Chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1610-1617.
- Pueyo, J.J. & Gómez-Moreno, C. (1991). Characterization of the cross-linked complex formed between ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and flavodoxin from *Anabena* PCC 7119. *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 149-156.
- Rich, P. (1991). The osmochemistry of electron-transfer complexes. *Biosci. Rep.*, **11**, 539-571.
- Rumberg, B., Schubert, K., Strelow, F., & Tran-Anh, T. (1990). The H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio at the H<sup>+</sup>-ATP-synthase of spinach chloroplasts is four. In Baltscheffsky (Ed.), *Current Research in Photosynthesis Vol. III*. (pp. 125-128). Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
- Sanders, C.E., Melis, A., & Allen, J.F. (1989). In vivo phosphorylation of proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 after chromatic acclimation to photosystem I or photosystem II light. *Biochim. Biophys. Acta*, **976**, 168-172.
- Saygin, O., Gerken, S., Meyer, B., & Witt, H.T. (1986). Total recovery of O<sub>2</sub> evolution and nanosecond reduction of chlorophyll-a<sub>II</sub><sup>+</sup> (P-680<sup>+</sup>) after inhibition of water cleavage with acetate. *Photosynth. Res.*, **9**, 71-78.
- Silverstein, T., Cheng, L., & Allen, J.F. (1993). Chloroplast thylakoid protein phosphatase reactions are redox-independent and kinetically heterogenous. *FEBS Lett*, **334**, 101-105.

- Sippola, K. & Aro, E.-A. (1999). Thiol redox state regulates expression of *psbA* genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 425-433.
- Slovacek, R.E., Crowther, D., & Hind, G. (1980). Relative activities of linear and cyclic electron flows during chloroplast CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 495-505.
- Takahama, U., Shimizu-Takahama, M., & Heber, U. (1981). The redox state of the NADP system in illuminated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 530-539.
- Tang, X.-S. & Diner, B.A. (1994). Biochemical and spectroscopic characterization of a new oxygen-evolving photosystem II core complex from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry*, **33**, 4594-4603.
- Telfer, A., Bottin, H., Barber, J., & Mathis, P. (1984). The effect of magnesium and phosphorylation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein on the yield of P-700-photooxidation in pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **764**, 324-330.
- Topf, J., Gong, H., Timberg, R., Mets, L., & Ohad, I. (1992). Thylakoid membrane energization and swelling in photoinhibited *Chlamydomonas* cells is prevented in mutants unable to perform cyclic electron flow. *Photosynth. Res.*, **32**, 59-69.
- Turpin, D.H. & Bruce, D. (1990). Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *FEBS Lett*, **263**, 99-103.
- van Thor, J.J., Jeanjean, R., Havaux, M., Sjollem, K.A., Joset, F., Hellingwerf, K.J., & Matthijs, H.C.P. (2000). Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta*, **44831**, 1-16.
- Vanlerberghe, G., Schuller, K.A., Smith, R.G., Feil, R., Plaxton, W.C., & Turpin, D.H. (1990). Relationship between NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation rate and *in vivo* phosphoenol pyruvate carboxylase activity: regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.*, **94**, 284-90.
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Gal, A., Andersson, B., & Ohad, I. (1995). Activation/deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25225-25232.
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Rich, P., Ohad, I., & Andersson, B. (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1585-1590.
- Walters, R.G. & Horton, P. (1994). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**, 133-158.
- Weiss, E. & Berry, J.A. (1987). Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **894**, 198-208.

- Wendler, J. & Holzwarth, A.R. (1987). State transitions in the green alga *Scenedesmus obliquus* probed by time-resolved chlorophyll fluorescence spectroscopy and global data analysis. *Biophys. J.*, **52**, 717-728.
- Whitmarsh, J. & Ort, D.R. (1984). Stoichiometries of electron transport complexes in spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**, 378-389.
- Wiessner, W. (1965). Quantum requirement for acetate assimilation and its significance for quantum measurement in photophosphorylation. *Nature*, **205**, 56-57.
- Wiessner, W. (1968). Enzymaktivität und Kohlenstoffassimilation bei Grünalgen unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Typs. *Planta*, **79**, 92-98.
- Wiessner, W. & Amelunxen, F. (1969). Beziehungen zwischen submikroskopischer Chloroplastenstruktur und Art der Kohlenstoffquelle unter phototrophen Ernährungsbedingungen bei *Chlamydomonas stellata*. *Arch. Microbiol.*, **66**, 14-24.
- Wilhelm, C. & Wild, A. (1984). The variability of the photosynthetic unit in *Chlorella* II. The effect of light intensity and cell development on photosynthesis, P-700 and cytochrome f in homocontinuous and synchronous cultures of *Chlorella*. *J. Plant Physiol.*, **115**, 125-135.
- Witt, H.T. (1975). Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of Photosynthesis* (pp. 493-554). New York: Academic Press.
- Wollman, F.A. & Lemaire, C. (1988). Studies on kinase-controlled state transitions in photosystem II and *b<sub>f</sub>* mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 85-94.
- Yin, Z.H., Siebke, K., & Heber, U. (1991). Light-dependent pH changes in leaves of C3 plants. IV. Action spectra indicate indirect energization of proton transport into mesophyll vacuoles by cyclic photophosphorylation. *Planta*, **184**, 30-34.
- Yruela, I., van Kan, P.J.M., Muller, M.J., & Holzwarth, A.R. (1994). Characterization of a D1-D2-cyt *b-559* complex containing 4 chlorophyll *a/2* pheophytin *a* isolated with the use of MgSO<sub>4</sub>. *FEBS Lett*, **339**, 25-30.
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., & Wollman, F.A. (1999). The Q<sub>o</sub> site of cytochrome *b<sub>f</sub>* complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.*, **18**, 2961-2969.



## Publikációs lista

(A dolgozatban felhasznált közleményeket \*-jelöli.)

1. Demeter, S., Goussias, Ch., Bernát, G., **Kovács, L.** & Petrouleas, V. (1993) Participation of the  $g = 1.9$  and  $g = 1.82$  EPR forms of the semiquinone-iron complex,  $Q_A^-Fe^{2+}$  of photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively. *FEBS Lett.* **336**, 352-356
2. Hedge, U., Padhye, S., **Kovács, L.**, Vozár, A. & Demeter, S. (1993) Modification of histidine residues of photosystem II by diethyl-pyrocabonate inhibits the electron transfer between the primary ( $Q_A$ ) and secondary ( $Q_B$ ) quinone acceptors. *Z. Naturforsch.* **48c**, 896-902
3. \* Demeter, S., Janda, T., **Kovács, L.**, Mende, D. & Wiessner, W. (1995) Effects of in vivo  $CO_2$ -depletion on electron transport and photoinhibition in the green algae, *Chlamydomobryx stellata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 166-171
4. \* Demeter, S., Janda, T. & **Kovács, L.** (1995) Photoinhibition in  $CO_2$ -depleted green algae, *Chlamydomobryx stellata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Phytopath. Hung.* **30**, 71-80
5. Demeter, S., Nugent, J. H. A., **Kovács, L.**, Bernát, G. & Evans, M. C. W. (1995) Comparative EPR and thermoluminescence study of anoxic photoinhibition in Photosystem II particles. *Photosynth. Res.* **46**, 213-218
6. **Kovács, L.**, Hedge, U., Padhye, S., Bernát, G. & Demeter, S. (1996) Effects of Potassium-(picrate)-(18-crown-6) on the Photosynthetic Electron transport. *Z. Naturforsch.* **51c**, 539-547
7. Seregélyes, Cs., Mustárdy, L., Ayaydin, F., Sass, L., **Kovács, L.**, Endre, G., Lukács, N., Kovács, I., Vass, I., Kiss, Gy. B., Horváth, G. V. & Dudits, D. (2000) Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. *FEBS Lett.* **482**, 125-130
8. \* **Kovács, L.**, Wiessner, W., Kis, M., Nagy, F., Mende, D. & Demeter, S. (2000) Short- and long-term redox regulation of photosynthetic light energy distribution and photosystem stoichiometry by acetate metabolism in the green alga, *Chlamydomobryx stellata*. *Photosynth. Res.* **65**, 231-247
9. Bernáth, G., Padhye, S., Barta, Cs., **Kovács, L.** & Demeter, S. (2001) Chemical probes for water-oxidation: Synthetic manganese complexes in photoactivation of water splitting complex and as exogenous electron donors to photosystem II. *Z. Naturforsch.* **56c**, 755-766

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Dudits Dénesnek és Dr Vass Imrének az MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézete előző és jelenlegi igazgatójának a kutatómunkám alapvető feltételeinek biztosításáért.

Megkülönböztetett köszönettel tartozom Dr. Demeter Sándornak, a biológiai tudományok doktorának, csoportvezetőmnek aki témavezetőként sokoldalú értékes segítséget adott munkámhoz. Tudományos irányítótevékenysége, tanácsai, útmutatásai szakmai fejlődésem szempontjából meghatározóak voltak.

Köszönöm Dr. Garab Győző jelenlegi csoportvezetőmnek a dolgozat és a publikációk elkészítéséhez adott tanácsokat és kritikai észrevételeit.

Úgyszintén köszönetet mondok Dr. Kis Mihály tudományos munkatársnak az RNS szint mérési módszere megismertetéséért és az együtt elvégzett munkáért. Köszönöm Dr. Nagy Ferenc csoportvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra csoportjának laboratóriumában ezen munka elvégzését, rendelkezésemre bocsátotta a szükséges anyagokat és eszközöket.

Ezuton köszönöm meg Prof. Wolfgang Wiessnernek, a Göttingeni Egyetem Növényélettani Tanszéke vezetőjének, és Dr. Dierk Mendének az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia emissziós mérések és a fényindukált citokróm *f* abszorpcióváltozás mérések elvégzésében nyújtott segítségüket az ottartózkodásom ideje alatt.

Továbbá köszönöm Dr. Hans Matthijsnek az Amszterdami Egyetem Mikrobiológiai Tanszéke kutatójának a fogadókészségét és együttműködését a ciklikus elektrontranszport és ciklikus fotofoszforiláció vizsgálatok végzésében és a laboratóriumában szerzett hasznos tapasztalatokat..

Végül köszönetemet fejezem ki mindazon munkatársaknak akikkel az elmúlt években együtt dolgoztam és tanácsaikkal, véleményükkel, közreműködésükkel segítették munkámat.