

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

**A LIPOIDHIÁNY HATÁSA CHLORELLA SEJTEK
SZERKEZETÉRE ÉS FOTOSZINTETIKUS
MŰKÖDÉSÉRE**

Herczeg Tamás

**JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM
BIOFIZIKAI TANSZÉK**

Szeged

1978



TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
BEVEZETÉS	1
I. LIPOIDEK, ZSIRSAV-BIOSZINTÉZIS ÉS ANNAK SPECIFIKUS GÁTLÁSA	4
1. A <i>C. pyrenoidosa</i> algában előforduló lipoidok és a lipoidok szerepe a fotoszintézisben	4
2. A zsírsav-bioszintézis gátlására felhasznált cerulenin jellemzése	9
II. NORMÁLIS ÉS LIPOID-HIÁNYOS CHLORELLA KULTURÁK TULAJDONSÁGAINAK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA.....	11
1. Normális és lipoid-hiányos szinkronizált <i>Chlorella</i> kulturák szaporodása	11
2. A lipoidhiány befolyása a <i>Chlorella</i> sejtek szerkezetére	20
a) Normális és lipoid-hiányos sejtek ultrastruktúrája	20
b) A lipoidhiány befolyása a plasztisz membránok molekuláris rendezettségére	23
c) Normális és lipoid-hiányos sejtek pigmentrendszere	27
d) A lipoidhiány befolyása a klorofillok in vivo állapotára	30
3. A lipoidhiány befolyása a <i>Chlorella</i> fotoszintetikus működésére	36
a) A klorofil komplexek primér fényreakciójának kinetikája normális és lipoidhiányos sejteknél	36
b) A klorofil komplexek primér fényreakciójával ellentétes folyamatok néhány tulajdonsága lipoid-hiányos sejteknél	42
c) A 2. fotokémiai rendszer működése normális és lipoid-hiányos sejteknél	52
III. AZ EREDMÉNYEKBŐL LEVONHATÓ NÉHÁNY KÖVETKEZTETÉS	56
IRODALOM	61

B E V E Z E T É S

Ismereteink szerint S. Hales volt az első, aki már 1727-ben feltételezte, hogy a növényi anyagok egy része a levegőből származik, és a levegő anyagainak növényi anyaggá való átalakításához fény szükséges. Azt, hogy ez a folyamat különböző pigmentekhez kötött, csak másfél évszázaddal később Engelmann mutatta ki különböző alga sejtek és aerotaktikus baktériumok felhasználásával. Nyilvánvalóvá vált azonban az is, hogy egyedül a pigmentek jelenléte nem elegendő ahhoz, hogy megvilágítás hatására a levegő egyik szervetlen vegyületéből - a CO_2 -ből - szerves vegyület képződjön. A kísérleti módszerek és technikák - elsősorban az elektronmikroszkópia - fejlődése volt szükséges ahhoz, hogy felismerjék, hogy a fotoszintézis primer folyamata speciális strukturákban, különböző pigmenteket tartalmazó lipoproteid membránokban képes maradéktalanul lejátszódni. E membránok szerkezete már egy évtizede eléggé jól ismert (3), kevesebbet tudunk viszont az egyes komponenseknek az in vivo fotoszintézisbeli funkciójáról. Különösen érvényes ez a megállapítás a membrán lipoidok esetében, annak ellenére, hogy az utóbbi évek modellrendszereken (bimolekuláris lipid membránokon, liposzómákon, detergens rendszereken, stb.) végzett vizsgálatai és membrán rekonstitúciós törekvései számos értékes eredményt szolgáltatottak (7, 8).

Munkánk céljával azt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk milyen szerepük van a lipoidoknak az élő rendszerekben, in vivo körülmények között lezajló fotoszintetikus folyamatokban. Célunk kitűzésekor tisztában voltunk azzal a ténnyel, hogy élő rendszerek vizsgálata nagyon leszűkíti a kísérleti lehetőségeket; nem alkalmazható számos olyan módszer (enzimes kezelés, teljes delipoidálás, magasabb hőmérsékletű mérések, stb.), melyek élettelen rendszerek esetén kézenfekvőek volnának. Ezenkívül - a vizsgálati objektumok összetettsége miatt - nem használhattunk számos olyan fizikai-kémiai eljárást sem, melyek közvetlen felvilágosítást adtak volna a lipoidokról, azok állapotáról. (Pl. gázkromatográfiás vizsgálatokból könnyen lehet következtetni a különböző zsírsavak minőségére és mennyiségére, azonban az analízishez egész sejteket nem lehet felhasználni; a sejtekből előbb ki kell vonnunk a zsírsavakat és csak a kivonatot lehet gázkromatográfiás analízisnek alávetni.) Ezen okok miatt vizsgálatainkban aránylag egyszerű, közvetett módszert alkalmaztunk: Élő objektumokat bizonyos fokig lipoid hiányossá tettünk azzal, hogy zsírsavsintézisét gátlottuk, majd nyomonkövettük, hogy a zsírsavhiány milyen változást okoz a különböző fotoszintézis jellemzőkben. A kísérleti munka elvégzéséhez célszerűnek látszott olyan objektum választása, amelynek életfolyamatai jól kézben tarthatóak és ellenőrizhetők, nagyszámú mérést tesz lehetővé,

fenntartása nem túlságosan bonyolult feladat, és várhatóan érzékenyen reagál a lipoid összetételben bekövetkező változásra. Ezeket a követelményeket az egysejtű élőlények elégitik ki leginkább, ezért mi is közülük választottuk vizsgálati alanyunkat, a *Chlorella pyrenoidosa*-t. A zsírsavhiány előidézése szempontjából fontosnak tartottuk, hogy az a módszer, ahogyan a hiányt előidézzük specifikus legyen a lipoidokra, azaz a sejt többi komponensének állapotát a lehető legkisebb mértékben változtassa meg. Ennek a feltételnek egy zsírsavsintézist gátló antibiotikum, a cerulenin teljes mértékben elegendő volt, így munkánk során a zsírsavhiány és ezzel a lipoidösszetétel megváltoztatásának előidőzésére ezt a vegyületet használtuk fel.

Saját eredményeink leírása előtt szükségesnek látszik két témakör rövid irodalmi áttekintése. Az első témakör azokat az ismereteket foglalja össze, melyek a *C. pyrenoidosa* algában előforduló lipoidokkal és azok fotoszintézisbeli szerepével foglalkoznak. A második témakör a cerulenin legfontosabb tulajdonságait tárgyalja. Mindkét terület megismerése saját eredményeink helyes értelmezéséhez szükséges.

I. LIPOIDEK, ZSIRSAV-BIOSZINTÉZIS ÉS ANNAK SPECIFIKUS GÁTLÁSA

1. A C. pyrenoidosa algában előforduló lipoidok és a lipoidok szerepe a fotoszintézisben

Az algák lipoidjai, a magasabbrendű növények kloroplasztiszainak lipoidjaihoz hasonlóan nagyrészt felületaktív tulajdonságokkal rendelkező molekulákból állnak, amelyek egyaránt strukturális elemekként és az organellek metabolitjaként szerepelnek. (Bár a lipoidokhoz tartoznak, a jelen ismeretében nem szerepelnek a szteroidok. Ennek elsősorban az az oka, hogy a vegyületek viszonylag kis mennyiségben vesznek részt a bennünket érdeklő plasztizmembránok alkotásában, így vizsgálatukat számunkra mellőzhetőnek éreztük.)

A fiatal alga sejtekben nagyon kevés tartalék zsír halmozódik fel, és a sejt lipoidjeinek nagy része a kloroplasztiszban található. A C. pyrenoidosa sejtekben előforduló lipoidok 3 csoportba sorolhatók: galaktolipoidok, foszfolipoidok és szulfolipoidok. E csoportok legfontosabb tagjait és megoszlásukat a C. pyrenoidosa sejtekben Benson és Shibuya (4) nyomán az 1. táblázat mutatja:

Komponensek neve	Koncentráció [mM]
β -D-Galaktozil glicerol	18
α -D-Galaktozil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galaktozil glicerol	13
α -Szulfo- α -D-kinovopiranozil glicerol	6,5
Glicerofoszforil glicerol	6
Glicerofoszforil kolin	5
Glicerofoszforil mioinozitol	2
Glicerofoszforil etanolamin	0,1
Glicerofoszforil szerin	0,05
Glicerol	7

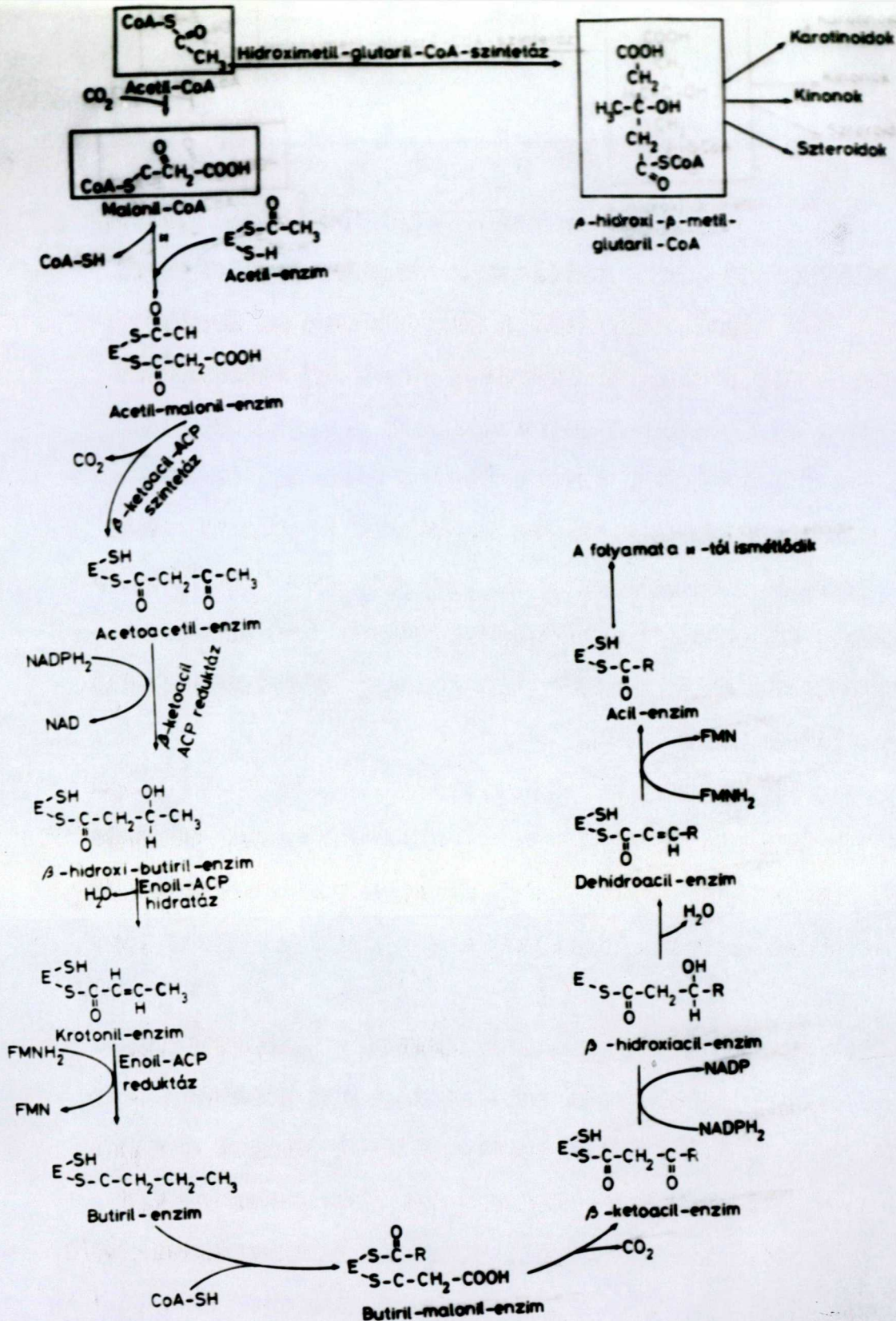
1. táblázat. A *C. pyrenoidosa*-ban előforduló főbb lipoidok és koncentrációjuk

Mivel a lipoidok fizikai-kémiai tulajdonsága, élettani szerepe döntő mértékben attól függ, hogy bennük milyen típusú zsírsavak fordulnak elő, ezért szükség van a *C. pyrenoidosa* sejtek zsírsavösszetételének ismeretére is. Nichols és munkatársainak (5, 6) munkája alapján a minimál táptalajon nevelt *Chlorella* zsírsavösszetétele a következő:

Zsírsav	Mennyiség [%]
12:0	nyomokban
14:0	1,8
14:2	1,4
16:0	24,5
16:1	7,9
16:2	5,2
16:3	nyomokban
18:0	2,8
18:1	2,8
18:2	41,0
18:3	12,0

2. táblázat. *Chlorella* sejtek zsírsavösszetétele

(A kettőspont előtt álló szám a zsírsav szénatomjainak számát, a kettőspont utáni szám a zsírsavban előforduló kettős kötések számát jelenti.)



ACP: acil carrier protein

CoA-SH: szabad koenzim-A

FMNH₂ és FMN: Flavin-mononukleotid redukált és oxidált formája

NADPH₂ és NADP: Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált és oxidált formája

R=C₆H₁₃

1. ábra. A zsírsavszintézis biokémiai folyamatának vázlata

Az alga sejtek zsírsavszintézise az élővilágban általánosan előforduló úton, multienzim-komplex segítségével megy végbe (1. ábra). Kiindulási vegyületnek az acetyl-koenzim-A (Acetyl-CoA) tekinthető, amely az intermediér anyagcsere - elsősorban a citrát-ciklus - egyik központi terméke. Ez a vegyület a karotinoidok, kinonok, szteroidok kiindulási vegyülete is, de különböző biokémiai utak lehetővé teszik előfordulását az élő szervezetben előforduló, szinte valamennyi molekula-fajtában. (Az 1. ábrán feltüntetett biokémiai utak vázlatának részletesebb kifejtése (1, 2)-ben található.)

Az egyes lipoid-fajták funkcionális szerepéről aránylag keveset tudunk. Kloroplasztisz fragmentumokon végzett galaktolipáz-enzimes vizsgálatok alapján feltételezik (11), hogy a galaktolipoidok szorosan körülveszik azokat a klorofill molekula-aggregátumokat, amelyek az egyes fotorendszer (PSI) reakció centrumokat alkotják. A galaktolipoidok enzimatisz hidrolizise csökkenti a PSI reakció centrumokra jellemző folyamatok hatékonyságát, melyet a reakciócentrumok és az elektrontranszport lánc donor oldala közötti távolság növekedésével, vagy az elektrontranszport lánc tagjainak az optimálistól eltérő orientációjával lehet magyarázni. Bergelson és Barsukov fontos szerepet tulajdonít a foszfolipoidok membránbeli aszimmetrikus elhelyezkedésének (16). Feltételezéseik szerint az aszimmetrikus elhelyezkedésnek fontos szerepe lehet a membránok transzport

folyamatainak szabályozásában, az enzimek aktivitásának biztosításában, a sejtek alakváltozásában és kemikáliák iránti érzékenységében.

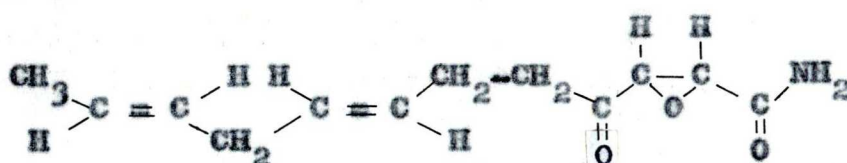
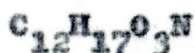
Benson és munkatársai a lipoidok strukturaképző tulajdonságait vizsgálták (13, 14). Feltételezik, hogy a *Chlorella* sejtekben is nagy koncentrációban előforduló difoszfatidil glicerolnak bipoláris tulajdonságánál fogva jelentős membrán stabilizáló szerepe van. A szulfolipoidok szerepe kevésbé felderített. Feltételezik (4), hogy ez a komponens a fotoszintetikus uton redukált szulfátok fő tartálékaként szerepel. Megfigyelték azt is, hogy a kénhiányos táptalajon nevelt algáknál a szulfolipoidok szulfoproteinek szintéziséhez is felhasználódhatnak (15). Shaw és munkatársai kimutatták, hogy a kloroplaszt membránok zsírsavjainak 50-60%-a eltávolítható anélkül, hogy a PSI és a kettes fotorendszer (PSII) közötti elektrontranszfer mértéke csökkene (9). Ennek ellenére a lipoidoknak elsőrendű szerepet tulajdonítanak a fotoszintetikus apparátus normális szerveződésében. Fork és munkatársai (10, 12) *Anacystis nidulans* algán kimutatták, hogy a membrán-lipoidok fázisállapota jellemző módon befolyásolja az alga fotoszintetikus paramétereit. A lipoidok fázisátmenete megváltoztatja a klorofill-a molekulák fluoreszcencia hatásfokát, az elektrontranszport reakciók aktivációs energiáját, a tilakoid membrán konformációs változásait és a PSI reakció-centrumának, a P700-nak redukcióját. Abból a tényből, hogy a plasztokinon az elektrontranszport lánc leglipofilabb tagja, azt a következtetést vonták le, hogy az elektron-

transzport lánc tagjai közül a plasztokinin a legérzékenyebb a membrán-lipoidok állapotára.

A fentiakat összegezve elmondhatjuk, hogy a különböző lipoidok jelenléte feltétlenül szükséges a fotoszintézis normális lefolyásához. Ma még azonban kevésbé ismert, hogy mi is az egyes lipoid-fajták konkrét szerepe a folyamatban.

2. A zsírsav-bioszintézis gátlására felhasznált cerulenin jellemzése

A *Cephalosporium caerulens* gomba által termelt cerulenin antibiotikumot 1960-ban fedezték fel Hata és munkatársai (17). A vegyület kémiai elnevezése (2S), (3R) 2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodekadienoil amid, (cerulenin), szerkezeti képlete a következő (18):



A cerulenin szobahőmérsékleten szilárd halmazállapotú, kloroformban, széntetrakloridban, benzolban és más szerves oldószerekben jól, vízben gyengébben oldódó vegyület. Biológiai hatását tekintve ismert, hogy a cerulenin meggátolja számos baktérium és gomba törzs növekedését (19-21). A hatásmechanizmus ma már igen részletesen felderített. Abból

a tényből, hogy a cerulenin hatása jelentősen revertálható különböző lipoidokkal - elsősorban zsírsavakkal - azt a következtetést vonták le, hogy a cerulenin hatása a lipoidok szintézisével kapcsolatos (22-24). Az 1970-es évek elején sikerült tisztázni a hatás pontos, molekuláris mechanizmusát is; eszerint a cerulenin a β -ketoacil-acil carrier protein szintetáz (1. 1. ábra) működését gátolja. A cerulenin kovalens kötéssel kapcsolódik az enzimhez, így hatása irreverzibilis (25). A hatás nagymértékben specifikus, bár többen kimutatták, hogy a cerulenin képes egyéb olyan reakciók gátlására is, melyek katalizáló enzimeik koenzim-A származékokat használnak szubsztrátként (26-28). Kiderült, hogy ez a másodlagos gátlás szintén egy enzimmel, a β -hidroxil- β -metilglutaril koenzim-A szintetázzal kapcsolatos. Ez az enzim a szteroidok, kinonok, karotinoidek bioszintézisének egyik kezdeti reakcióját katalizálja (1. 1. ábra). Lényeges azonban megjegyezni, hogy ez utóbbi folyamat gátlásához legalább 25-ször nagyobb cerulenin koncentráció kell, mint amennyi a zsírsavszintézis teljes gátlásához elegendő (23).

Bár a magasabbrendű organizmusokra a cerulenin nem toxikus, ez nem jelenti azt, hogy ne lehetne felhasználni mint biokémiai eszközt annak érdekében, hogy magasabbrendűekben is tisztázzák egyes életfolyamatoknak a lipoidokkal való kapcsolatát. Eddig - talán a kísérletek nehézsége miatt - aránylag kevés adat áll rendelkezésünkre a fotoszintetizáló szervezetek és a cerulenin-hatás kap-

csolatáról. Ismeretes, hogy a cerulenin képes hatékonyan gátolni a zsírsavszintézist a kétszikű abesszin káposzta levelében (29) és a burgonya gumójában is. Ez utóbbiban képes meggátolni az u.n. sebzési légzést és a cianid rezisztens légzés kialakítását is (30).

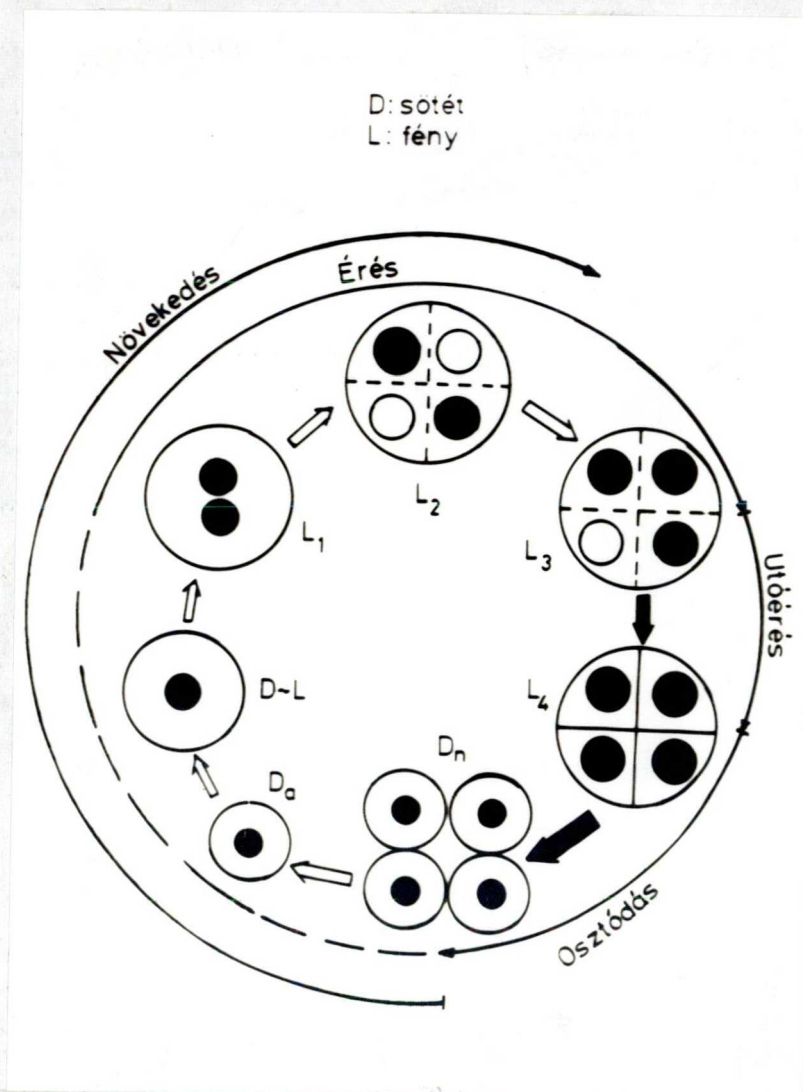
II. NORMÁLIS ÉS LIPOID-HIÁNYOS CHLORELLA KULTURÁK TULAJDONSÁGAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

1. Normális és lipoid-hiányos szinkronizált Chlorella kulturák szaporodása

Ismeretes, hogy a mikroorganizmusok életük során egy növekedési-fejlődési cikluson mennek át, amely ciklus megszületésükkel kezdődik és szaporodásukkal fejeződik be. Közben az élőlények különböző állapotokon mennek keresztül, mely állapotokban tulajdonságaik nagymértékben különbözhetnek. Természetes körülmények között a mikroorganizmus populációkban teljesen véletlenszerű, hogy egy kiválasztott egyedet milyen fejlődési stádiumban találunk, azaz a sejtek más-más fejlődési stádiumban vannak. Egy ilyen heterogén populációval végzett kísérlet esetében fennáll az a veszély, hogy a kapott eredmények rosszul reprodukálhatók, mivel maga a populáció is állandóan változik. Bizonyos módszerekkel azonban elérhető, hogy egy populáció minden egyede nagy valószínűséggel ugyanabban

a fejlődési stádiumban legyen, azaz a tenyészet szinkronizált legyen.

Fotoszintetizáló sejtek esetében a szinkronizáció legegyszerűbb módszere a fény - sötét viszonyok megfelelő, ritmikus változtatása (31). Egy fény-sötét periódus alatt a sejtek a következő állapoton mennek keresztül (32):



2. ábra. *Chlorella* sejtek életciklusának somatikus ábrázolása

(A fehér nyilak fénytől függő folyamatokat, a fekete nyilak fénytől független átalakulási lépéseket jelentenek.)

Az egyes állapotok jellemzői a következők:

D_n sejtek (születő D sejtek): Az L anyasejtekből ujonnan (sötétben) keletkezett sejtek. Sötétben tartva nem képesek osztódni.

D_a sejtek (aktív D sejtek): Fotoszintetikus aktivitásukat tekintve a legaktívabb sejtek, a D_n sejtekből megvilágítás hatására jönnek létre. Sötétben tartva nem képesek osztódni.

$D \sim L$ sejtek: A D és L közötti átmeneti állapot. Sötétben tartva nem képesek sejtosztódásra.

L_1 sejtek (éretlen L sejtek): Méretük nagyobb mint a D sejteké, de még nem kellőképpen nagyok ahhoz, hogy sötétben tartva osztódjanak.

L_2 sejtek (félíg érett L sejtek): Sötétben tartva képesek sejtosztódásra, azonban sejtosztódásuk nem tökéletes.

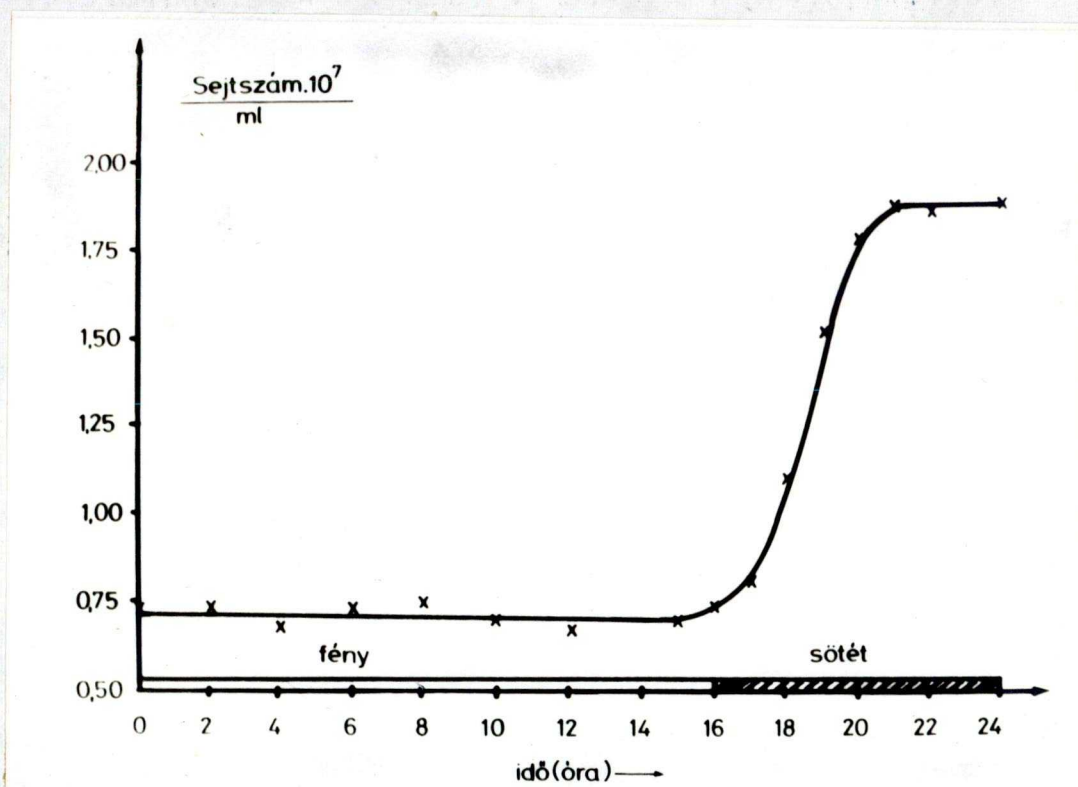
L_3 sejtek (érett L sejtek): Sötétben tartva tökéletes sejtosztódásra képesek.

L_4 sejtek (teljesen érett L sejtek): Közvetlenül a sejtosztódás előtti állapotban levő sejtek.

A szinkronizáció mértékét jelentősen befolyásolhatják a külső tényezők, - elsősorban a fényintenzitás, hőmérséklet, oxigénnel és CO_2 -dal való ellátottság -, ezért lényeges a paraméterek megfelelő stabilizálása, illetve ellenőrzése. Munkánk során a *C. pyrenoidosa* Emerson törzsének² szinkronizálása 16:8 órás fény-sötét ciklust használtunk. A fényintenzitás 10 W/m^2 , a hőmérséklet 24°C volt.

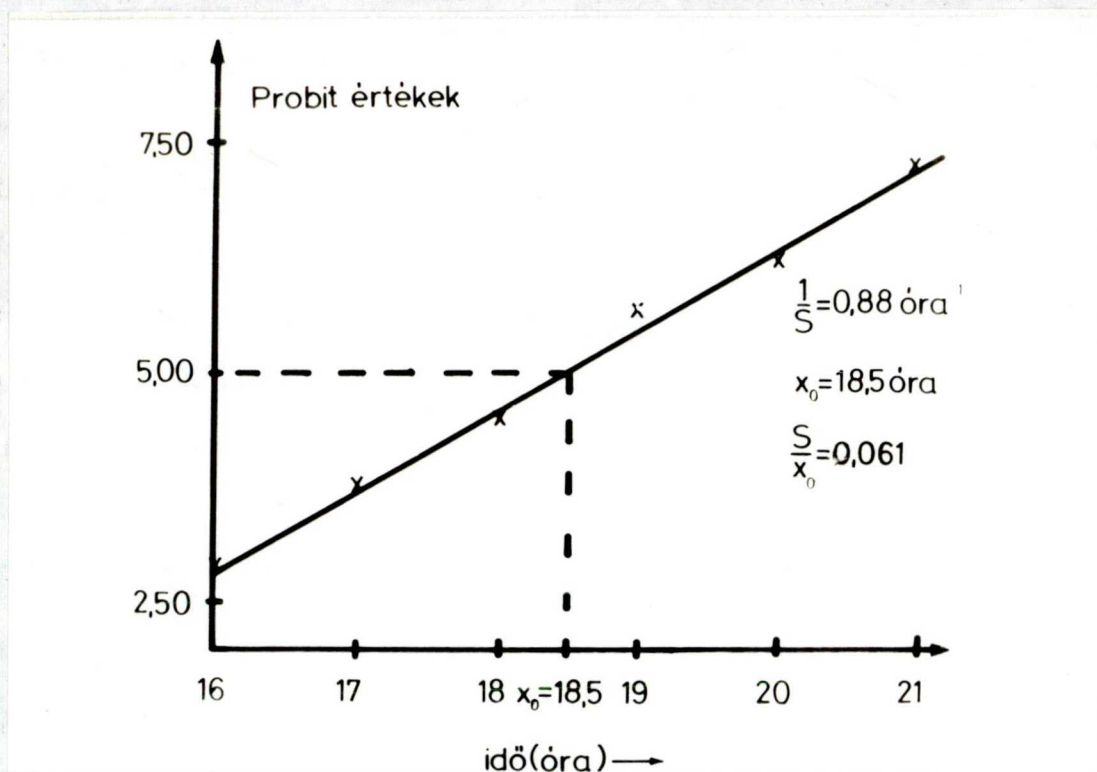
²A *C. pyrenoidosa* Emerson törzset prof. J. Lavoireltől (Gif-sur-Yvette, Franciaország) kaptuk.

Táptalajként kezdetben Tamiya-féle táptalajt (33) használtunk, később áttértünk a kereskedelemben kapható WUXAL növényi tápoldat 0,2 %-os oldatára. (A két tápoldatban kapott növekedés mértéke között különbség nem volt.) A tenyészeteket állandóan levegővel, vagy 4%-os CO_2 -ot tartalmazó levegővel átáramoltattuk és mágneses keverővel kevertük. A tenyészet sejtszámában 24 óra alatt bekövetkező változást a következő ábra mutatja:



3. ábra. *C. pyrenoidosa* szinkron tenyészetek sejtszáma egy fény-sötét periódus alatt

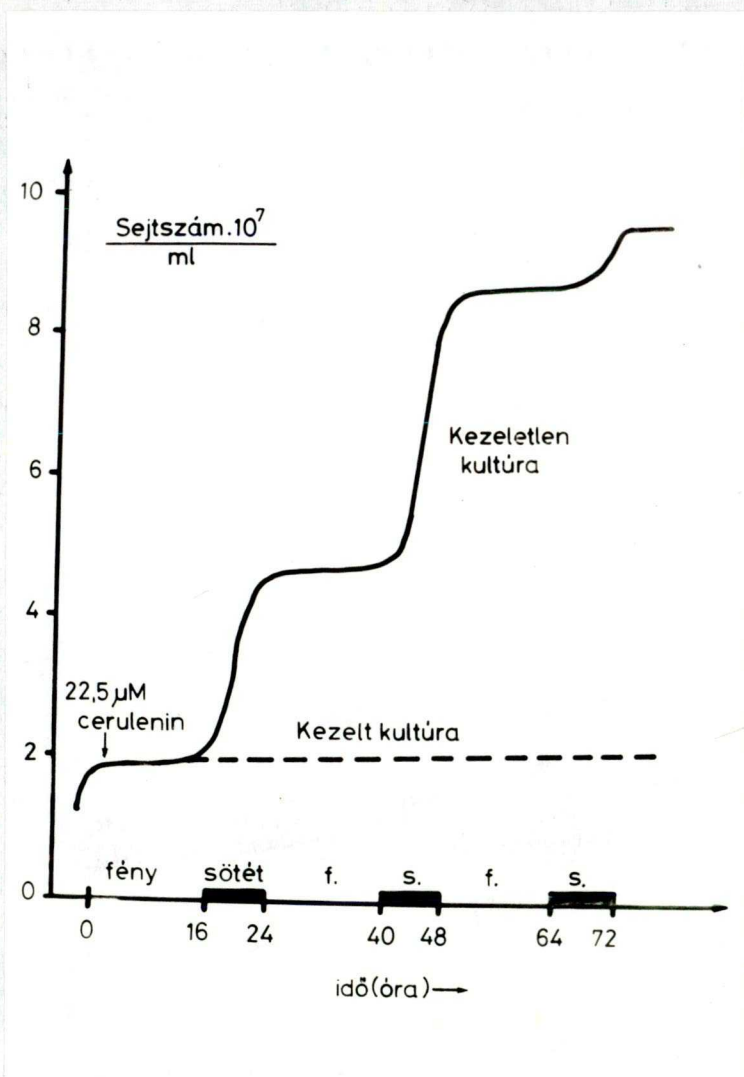
A szinkronizáció számszerű jellemzéséhez probit analízist végeztünk (34). Az adott sejtszámok százalékos gyakoriságát probit értékekre transzformáltuk, és ezeket az értékeket az idő függvényében ábrázoltuk (4. ábra).



4. ábra. *C. pyrenoidosa* szinkron tenyészetének probit értékei a kultura korának függvényében

A sejtosztódás főidejét az abszcisszán egyszerűen megkaphatjuk, ha meghatározzuk a probit = 5,0-höz tartozó időt. Ez esetünkben 18,5 órának adódott. A standard deviáció, a meredekség reciproka a sejtek korának a populáción belüli eloszlására jellemző. Esetünkben ennek értéke 1,14 óra. A standard deviáció és a sejtosztódás főideje önmagukban nem elegendőek a szinkronizáció jellemzésére, szokás viszont a kettő hányadosát, az u.n. variációs koeficientet felhasználni a szinkronizáció mértékének leírására. Esetünkben ez 0,061-nek adódott.

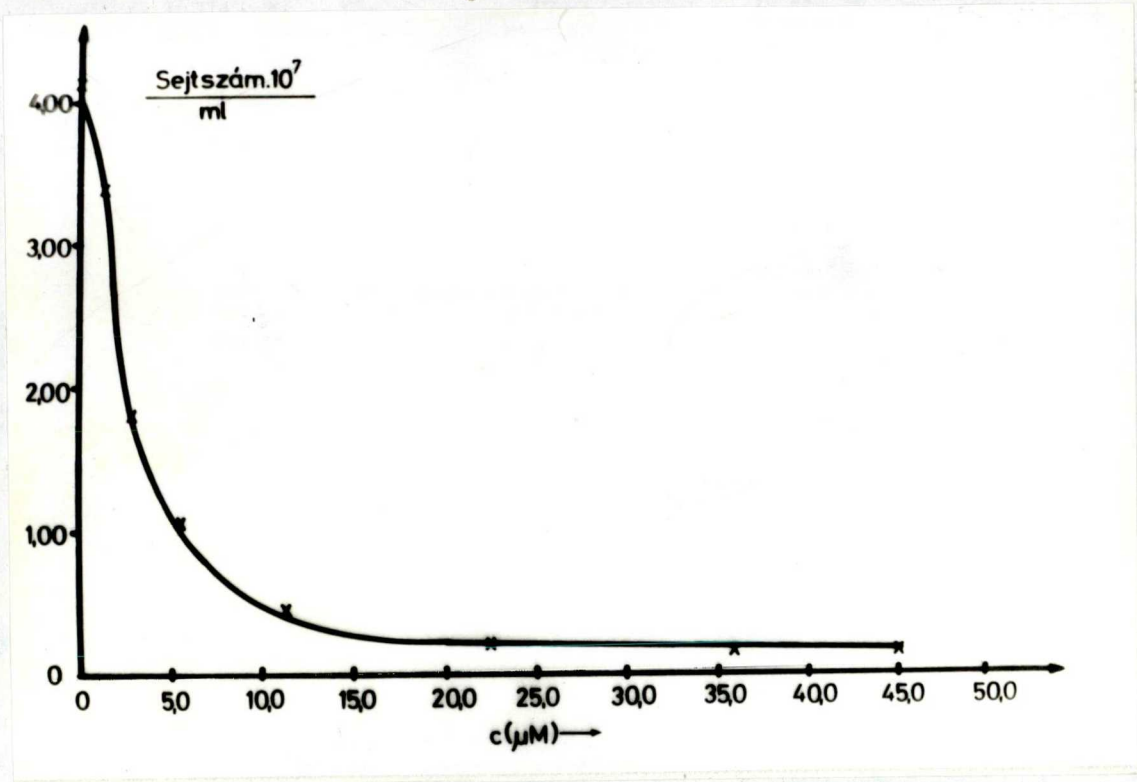
Kísérleteink során a cerulenint²² mindig néhány - rendszerint 3 - órával a fényperiódus bekapcsolása után adtuk a kulturákhoz. Ekkor a sejtek kb. a $D \sim L - L_1$ stádiumban voltak, mindenesetre nem érték el az L_2 stádiumot (35). Abban az esetben, ha az ilyen stádiumban levő kulturákhoz cerulenint adtunk, a tenyészetben nem tapasztalunk szaporodást (5. ábra).



5. ábra. Kezeletlen és 22,5 μ M ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* kulturák szaporodási görbéje

²²A cerulenin egy részét prof. S. Omuratól (Tokyo, Japán), más részét a MAKOR Chemicals LTD-től kaptuk.

A ceruleninnek a sejtosztódásra gyakorolt gátló hatása koncentrációtól függő. A következő ábra a 72 órás *C. pyrenoidosa* sejtkulturák sejtszámát mutatja a cerulenin koncentráció függvényében:



6. ábra. 72 órán át különböző koncentrációju ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* sejtszáma a cerulenin koncentráció függvényében

A 6. ábráról láthatjuk, hogy a sejtosztódás gátlása $22,5 \mu\text{M}$ koncentrációnál teljesnek mondható; nagyobb cerulenin koncentráció alkalmazása a sejtosztódás gátlásához felesleges. Ennélfogva további vizsgálatainkhoz $22,5 \mu\text{M}$ cerulenin koncentrációt használtunk. A 6. ábrán látható dózis-hatás görbe adataival grafikus módszerrel (36) meghatároztuk a koncentrációfüggésre jellemző u.n. 50 %-os citopatógén dózist (CPD_{50}). Ez $2,5 \mu\text{M}$ -nak adódott.

Érdemes megjegyezni, hogy a ceruleninnek a sejtosztódásra gyakorolt gátló hatása jelentős mértékben kivédhető, ha a táptalaj megfelelő zsírsavat tartalmaz (38). Ezt a hatást mi is észleltük; amikor a $22,5 - 22,5 \mu\text{M}$ cerulenint tartalmazó tenyészetekhez $100-100 \mu\text{g/ml}$ sztearinsavat, olajsavat, linolsavat és linolénsavat adtunk kálium só formájában, a következő eredményt kaptuk:

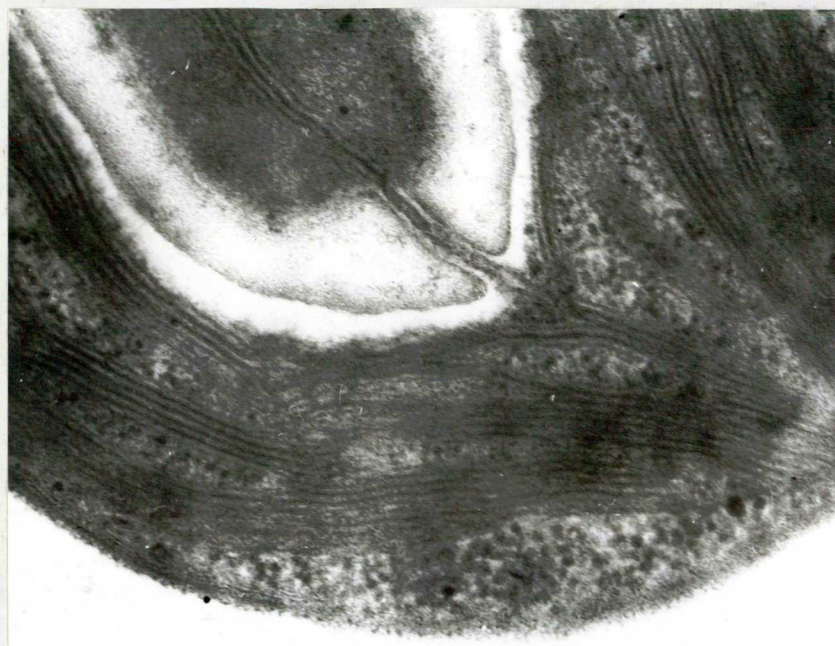
M i n t a	A szaporodás mértéke [%]
Kontroll	100
Cerulenin	0
Sztearinsav	33
Olajsav	58
Linolsav	59
Linolénsav	52

3. táblázat. Külsőleg adagolt zsírsavak hatása a 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* tenyészetek szaporodására

A táblázat alapján elmondható, hogy a ceruleninnel kezelt sejtek elsősorban az olaj- és linolsavat képesek felhasználni sejtosztódásukhoz az exogén zsírsavak közül. (Meg kell említenünk, hogy ezen eljárás további széleskörű vizsgálati lehetőséget biztosít, ugyanis lehetővé teszi különböző típusú és tulajdonságú zsírsavak beépítését a membránokba, és az így rekonstruált rendszerek tanulmányozása további adatokat szolgáltat a különböző életfolyamatok és a biomembránok kapcsolatáról.)



A. 31.000-szeres nagyítás



B. 77.000-szeres nagyítás



C. 23.000-szeres nagyítás



D. 77.000-szeres nagyítás

7. ábra. Kezeletlen (A, B) és 72 órán át 22,5 μ M ceruleninnel kezelt (C, D)
C. pyrenoidosa sejtek elektronmikroszkópos képe
(Módszer: (37))

Ezek után felmerülhet a kérdés, hogy a ceruleninnel kezelt kulturák szaporodásának elmaradása mellett megfigyelhető-e valamilyen szerkezeti és funkcionális elváltozás a sejtekben. A következőkben ezek vizsgálatára térünk át.

2. A lipoidhiány befolyása a Chlorella sejtek szerkezetére

a) Normális és lipoid-hiányos sejtek ultrastrukturája

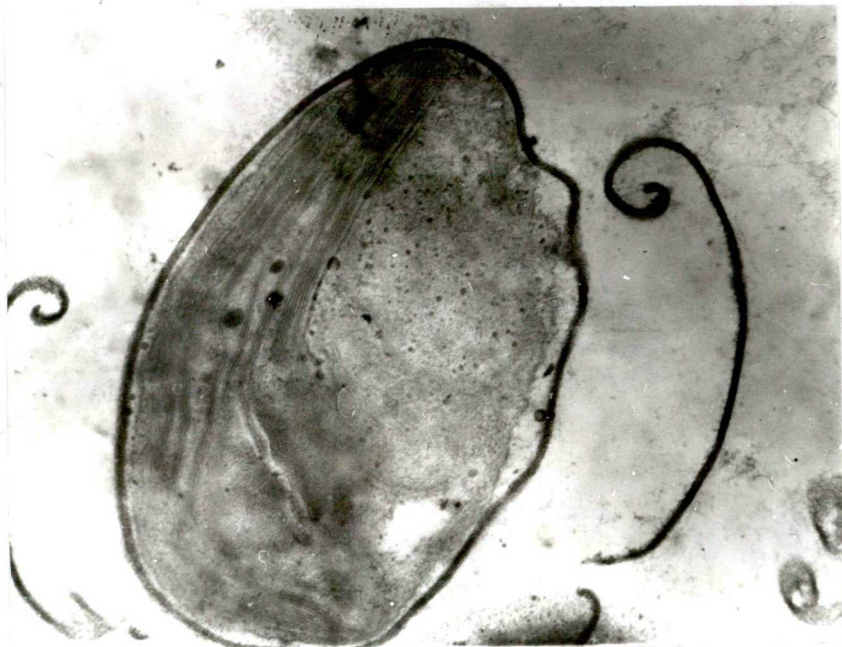
A *C. pyrenoidosa* felépítése leginkább nyomonkövethető elektronmikroszkópos vizsgálatokkal (37, 34). A normális sejtek legjellegzetesebb sejtalkotója az u.n. pirenoid szemcse, melyet kettős membrán szel ketté (7. ábra A, B felvételei). Jól elkülöníthető a sejtfa és a sejtmag is. A kloroplasztisz lamelláris szerkezetű, ellaposodott vesiculumból épül fel. A vesiculumbok membránjai épek, közel párhuzamos lefutásuak. Ezzel szemben jelentős változás figyelhető meg a ceruleninnel kezelt sejtek esetében. A 7. ábra C és D képei olyan *C. pyrenoidosa* sejteket mutatnak, melyeket 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezeltünk. A kezelt sejtekre jellemző, hogy a sejtfa és a citoplazma elválk egymástól (a sejt plazmolizál), a pirenoid szemcse kisebb darabokra esik szét. A kezeletlen sejteknél látott rendezett plasztisz membránok a kezeltsejtekénél "összekuszálódnak", hullámossá válnak. Meg-

jegyzendő még, hogy a sejtek OsO_4 -dal a kontrollnál kevésbé "festhetőek" (a képek kevésbé kontrasztosak).

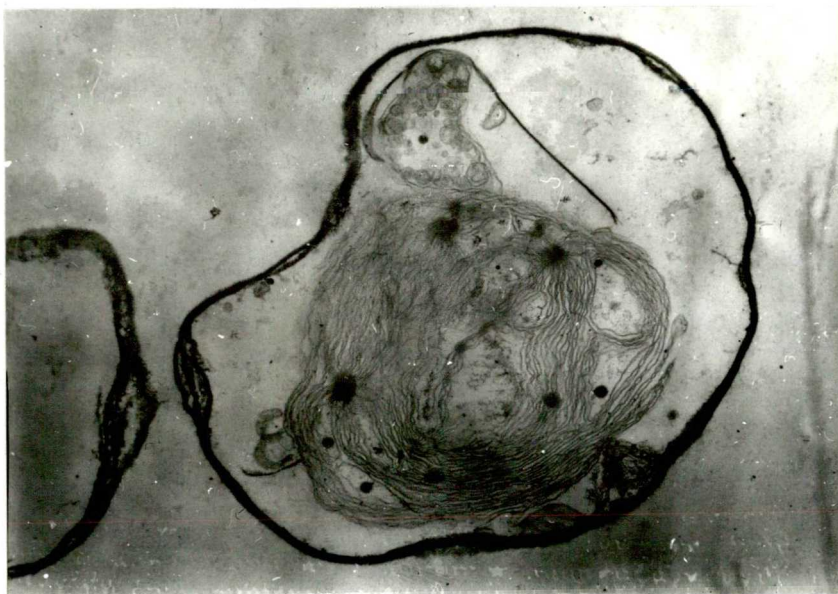
Statisztikát végeztünk arra vonatkozóan, hogy ezek a változások mennyire jellemzők a cerulenin kezelésre. Statisztikánkban a sejteket 4 csoportba osztottuk: Az első csoportba azokat a sejteket soroltuk, melyek teljesen épek és OsO_4 -dal jó kontrasztot adnak (pl. 7. ábra A és B képei). A második csoportba azokat a sejteket soroltuk, melyek bár ép szerkezetűek, viszont OsO_4 -dal kevésbé jó kontrasztot mutatnak (pl. 8. ábra A képe). (Feltehetőleg ezek a sejtek idősek, későbbi sejtosztódásra már nem képesek.) A harmadik csoportba a tönkrement, elhalt sejteket, ill. maradványaikat soroltuk (8. ábra B. kép). A negyedik csoportba azokat a sejteket soroltuk, melyek a cerulenin-kezelésre jellemző fellazított lamellával és feloldódott pirenoid rögökkel rendelkeznek (pl. 7. ábra C és D képei). A 72 órás tenyészeteken végzett statisztikánk eredményeit a következő táblázat mutatja:

Csoport	kontroll		22,5 μM cerulenin	
	sejtszám	[%]	sejtszám	[%]
1.	621	74,2	-	-
2.	138	16,5	-	-
3.	77	9,3	116	17,9
4.	-	-	531	82,1

4. táblázat. Kezeletlen és 72 órán át 22,5 μM ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* tenyészetek összetétele



A. 31.000-szeres nagyítás



B. 23.000-szeres nagyítás

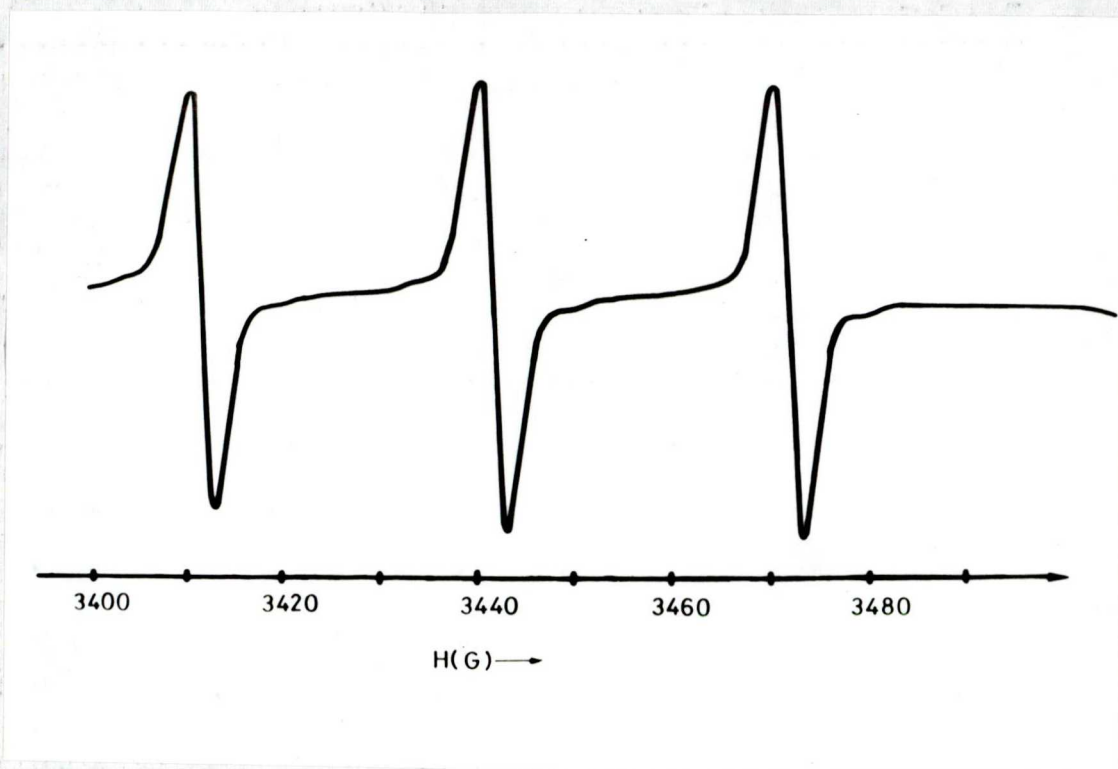
8. ábra. Idős és elhalt sejtek elektronmikroszkópos képe (A, ill. B kép)

A statisztikából kitűnik, hogy a populációk eléggé homogénnek mondhatók: a kezeletlen tenyészet sejtjeinek kb. 90 %-a szerkezetileg ép, míg a ceruleninnel kezelt kultura sejtjeinek több mint 80 %-a a kezelésre jellemző elváltozást mutat.

b) A lipoidhiány befolyása a plasztisz membránok molekuláris rendezettségére

A fentiekben tárgyalt szupramolekuláris szintű vizsgálatokon kívül szükségesnek látszott olyan kísérletek végrehajtása is, amelyek arra adnak választ, hogy a cerulenin-kezelés hogyan befolyásolja a plasztisz-membránok molekuláris rendezettségét. Ennek feltárására az elektron-spin-rezonancia spektruskópiái (ESR) mérő módszer, ezen belül is a spin-nyomjelzési technika tűnt a legmegfelelőbbnek, elsősorban kellő érzékenysége miatt. Egy másik előnye is volt számunkra e módszernek, ugyanis a kísérletekhez olyan spinjelzett vegyületeket használhattunk, melyek szerkezetileg igen közel álltak a zsírsavakhoz, így várhatóan a többi zsírsavakhoz hasonló módon épülnek be a membránba, miáltal ESR-spektroszkópiái viselkedésükkel a "természetes" zsírsavak környezetét tükrözik. Kísérleteinkhez metil-5-doxilsztearátot (M-5-DS)[■] használtunk. A következő ábra a kloroformban oldott M-5-DS ESR-jelét mutatja:

[■] Az M-5-DS-t K. Gwozdziński-től (Lodz, Lengyelország) kaptuk.

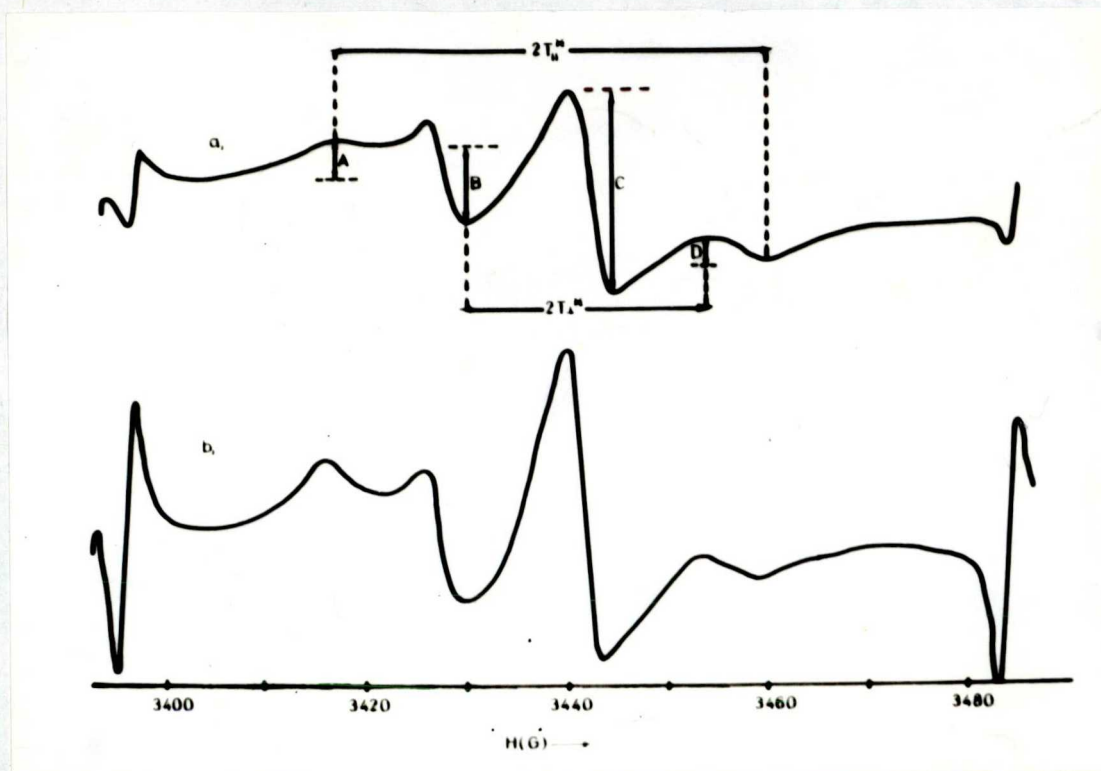


9. ábra. A kloroformban oldott metil-5-doxilsztearát ESR jele (első differenciálhányados görbe)
(Műszer: JEOL-spektrométer. Hőmérséklet kb. 20°C)

Jelentős változás következik be az ESR-jelben akkor, ha az M-5-DS-t 1 mM koncentrációban C. pyrenoidosa sejtekhez adjuk (10. ábra, "a" görbe).

A jelek alakjából szemikvantitatív következtetéseket vonhatunk le arra vonatkozóan, hogy a spinjelzett molekula milyen fluiditású környezetben van, ill. a zsírsavlánc mennyire flexibilis (69). A zsírsavlánc mozgékonyságának jellemzésére - az A/C, D/C hányadosok mellett - az S u.n. rendezettségi paramétert szokás megadni (70). A rendezettségi paraméter a következő módon számolható ki:

$$S = \frac{1}{2} \left(\frac{3T_{\parallel}^* - T_{\perp}^*}{T_{\parallel} - T_{\perp}} - 1 \right),$$



10. ábra. Netil-5-oxalilsztearát spin nyomjelző ESR spektruma kezeletlen ("a") és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt ("b") C. pyrenoidosa sejtekben (Mérési körülmények: 1. 9. ábránál)

ahol $T_{||}^*$ és $T_{\perp}^*$ az ESR jelekből leolvasható paraméterek, $T_{||}$ és $T_{\perp}$ pedig a tökéletesen orientált spinjelzett molekularendszerekre jellemző állandók. ($T_{||}$ azokra a molekulákra jellemző, melyek hosszanti tengelye az alkalmazott mágneses térrel párhuzamos, míg $T_{\perp}$ azokra, melyek tengelye a térre merőleges.) M-5-DS esetén $T_{||}$ értéke 30,8G, $T_{\perp}$ pedig 5,8G. Képezve az A/C és D/C arányokat, valamint meghatározva az S paramétert a következő eredményt kaptuk:

C. pyrenoidosa	A/C	D/C	S
Kontroll	0,218	0,115	0,548
Ceruleninnel kezelt	0,233	0,092	0,576

5. táblázat. Metil-5-doxilsztearát ESR spektrumának jellemzői kezeletlen és 72 órán át 22,5 μ M ceruleninnel kezelt C. pyrenoidosa sejtekénél

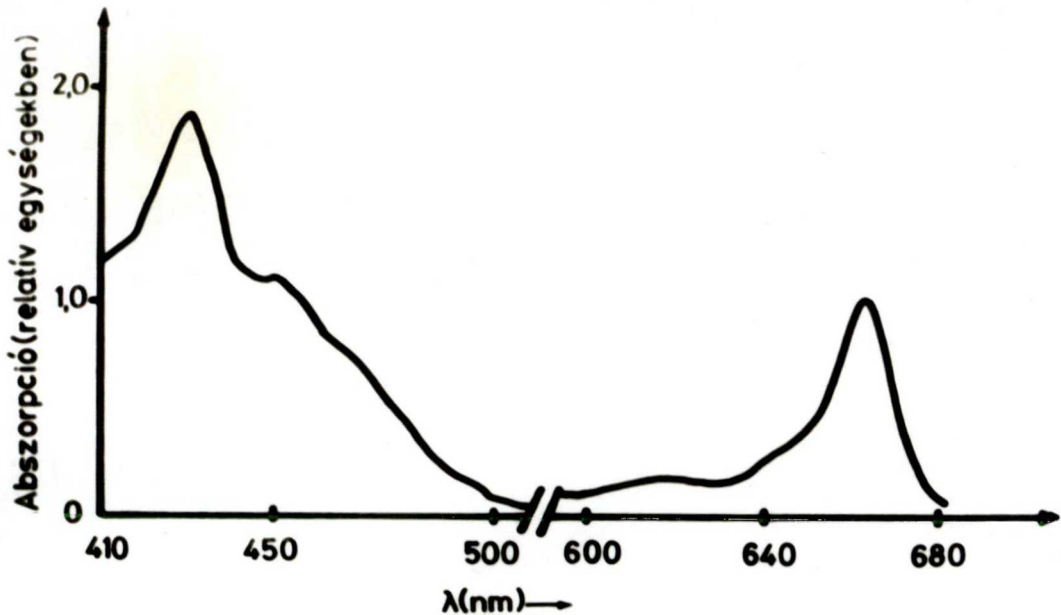
A spektrumok és a táblázat adatainak hasonlósága alapján úgy tűnik, hogy a cerulenin nem befolyásolja lényegesen a beépülő spinjelzett zsírsav molekulák mikro környezetét. Ez többféleképpen magyarázható. Feltételezhető pl., hogy - bár a zsírsavak erősen hidrofób tulajdonságaik - a spinjelzett molekulák nem tudnak beépülni a membránok lipoid fázisába, hanem a citoplazma-kolloidokban oszlanak meg. Ezt oly módon igyekeztünk kiküszöbölni, hogy az ESR spektrumokat Na-aszkorbát jelenlétében vettük fel. A Na-aszkorbát hidrofíl vegyület, amely redukáló tulajdonsága révén a spinjelzett molekulák szabad gyökeket megszünteti. Azok a molekulák azonban, melyek hidrofób környezetben - pl. a membránok lipoid fázisában - vannak, a redukciónak védettek. A másik elképzelés szerint a plazmatisz membránok egyes részein olyan pontok találhatók, melyekről a lipoidok - zsírsavak - könnyen kioldhatók, míg a visszamaradó membránfragmentumok gyakorlatilag megtartják eredeti szerkezetüket. Így a ceruleninnel kezelt algák membránjába beépülő spin-

jelzett molekulák praktikusán ugyanabba a mikrokörnyezetbe kerülnek, mint a kezeletlen sejteknél. (Az exogén zsírsavak beépülésének tanulmányosásához további - első-sorban autoradiográfiás - vizsgálatokat tervezünk elvégezni. Reméljük, hogy e vizsgálatok alapján megadható lesz az ESR jelek pontosabb magyarázata is.)

Az alábbiakban a fotoszintézissel szorosabb kapcsolatban levő jellemzők tárgyalására térünk át.

c) Normális és lipid-hiányos sejtek pigmentrendszer

Mint ismeretes, a fotoszintetizáló szervezetekben a fényenergiát különböző pigmentek gyűjtik össze és juttatják el a fotoszisztémák reakciócentrumáig. A *C. pyrenoidosa*-ban - hasonlóan más zöld algákhoz - klorofill-a, klorofill-b, α -karotin és β -karotin fordul elő legnagyobb mennyiségben, de kisebb mennyiségben előfordulnak különböző xantofiliek is (39). Minthogy a fotoszintetikus energiaátalakítás a fényenergia elnyelésével kezdődik, ezért e kezdeti lépésről információt nyerhetünk azáltal, ha vizsgáljuk a fényelnyelő molekulák abszorpciós tulajdonságait. Az alga sejtekben levő pigmentek fényelnyelő sajátosságait vizsgálhatjuk oly módon, hogy extraháljuk azokat a sejtekből, szerves oldószerbe - pl. dietil-éterbe - vesszük át és felvesszük az abszorpciós spektrumát. A *C. pyrenoidosa*ból kivont pigmentek dietil-éteres oldata a következő abszorpciós spektrumot adta:



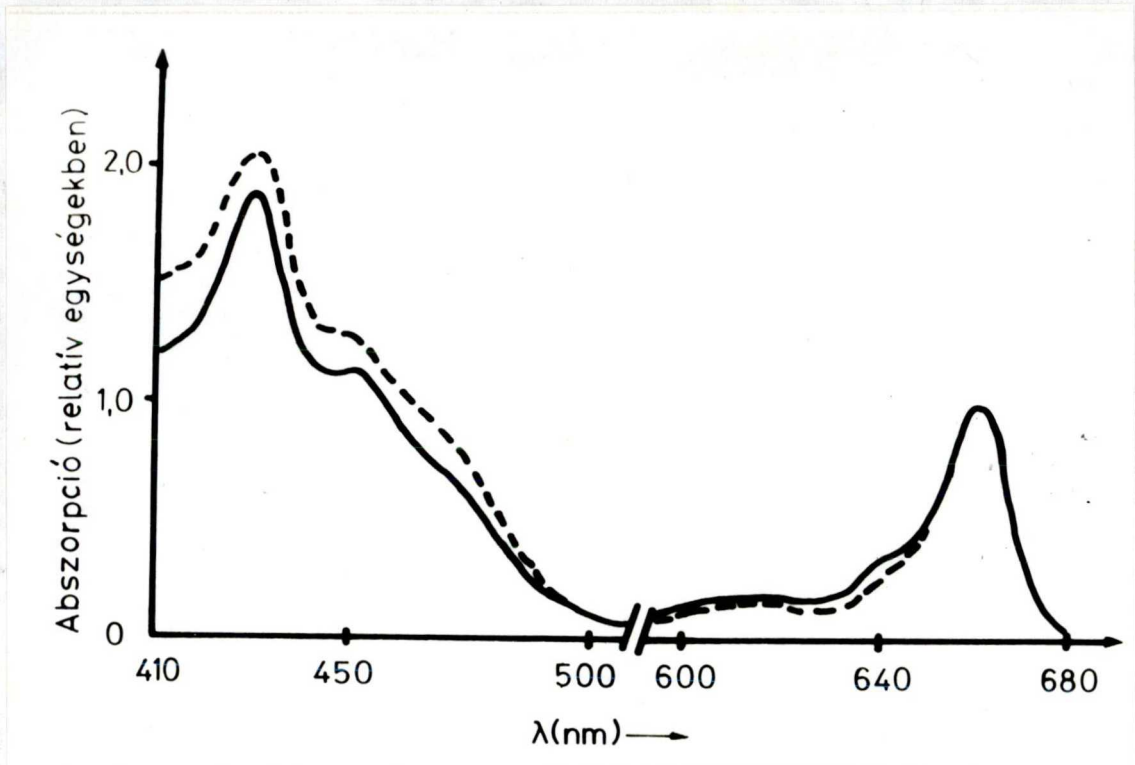
11. ábra. A *C. pyrenoidosa* dietil-éterben oldott pigmentjeinek abszorpciós spektruma
(Műszer: Unicam SP-1800 spektrofotométer
Hőmérséklet kb. 20°C, 1 cm-es kűvetta:
662 nm-nél 0,450 extinkció)

A pigmentoldatok abszorpciós spektruma alapján meghatározható a sejtek pigmentösszetétele. E célra mi az u.n. többhullámhossz módszert használtuk (40), és eredményül a következőt kaptuk:

Klorofill-a	5,07mm ² /10 ⁸ db sejt
Klorofill-b	1,66 "
Karotinoid	1,50 "
Klorofill-a/klorofill-b	3,05
Klorofill-a + klorofill-b karotinoid	4,48

6. táblázat. A *C. pyrenoidosa* sejtek pigmentösszetétele

Kérdés, hogy a cerulenin-kezelés befolyásolja-e a sejtek pigmentösszetételét. A következő ábra a 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt alga kultúrákból nyert, dietil-éterben oldott pigment extraktum abszorpciós spektrumát ábrázolja:



12. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (- - -) *C. pyrenoidosa* dietil-éterben oldott pigmentjeinek abszorpciós spektruma (Mérési körülmények: 1. 11. ábránál)

A 12. ábráról leolvasható, hogy a cerulenin-kezelés nem okozott drasztikus változást az extraktum abszorpciós spektrumában. Jelentősebb különbség csak a rövidebb hullámhosszu tartományban - 480 nm körül - figyelhető meg. A már említett többhullámhossz módszerrel meghatározva a pigmentösszetételt a következő eredményt kaptuk:

Klorofill-a	5,43 nmol/10 ⁸ db sejt
Klorofill-b	1,76 "
Karotinoid	2,31 "
Klorofill-a/klorofill-b	3,08
<u>Klorofill-a+klorofill-b</u> karotinoid	3,11

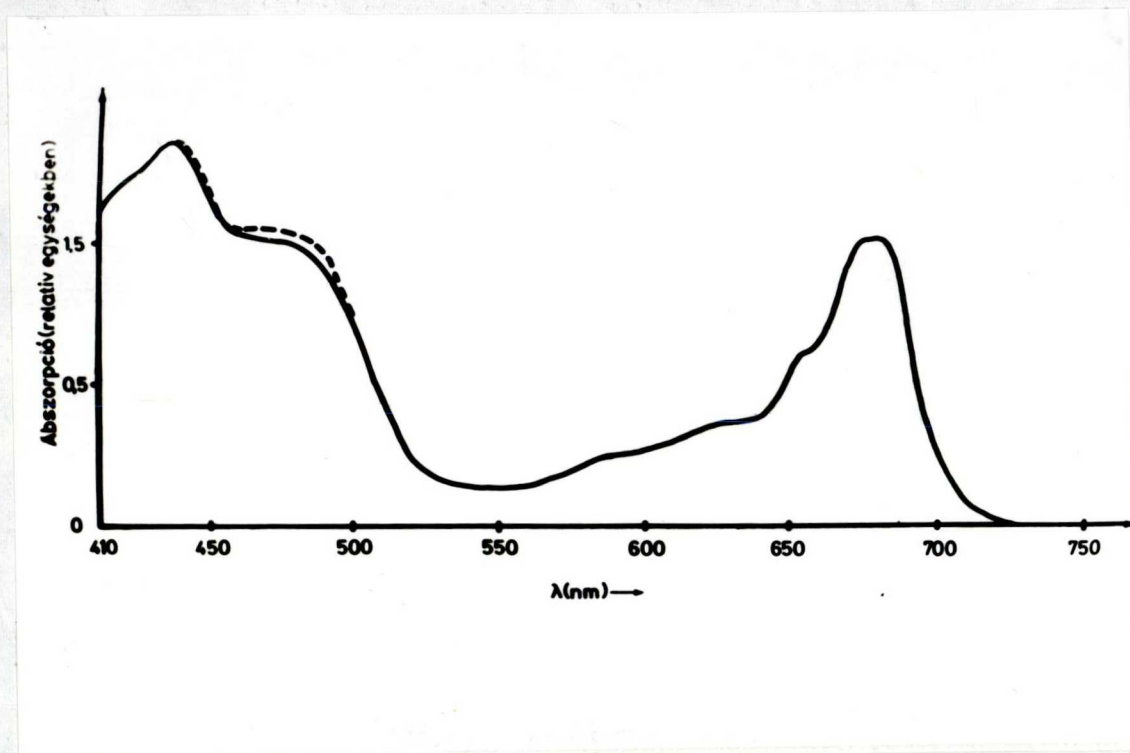
7. táblázat. A 72 órán át 22,5 μ M ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* sejtek pigmentösszetétele

A 6. és 7. táblázat egybevetéséből látható, hogy jellemzőbb eltérés - mégpedig növekedés - mutatkozik a ceruleninnel kezelt sejtek karotinoid tartalmában a kezeletlen kontrollhoz képest.

d) A lipcidhiány befolyása a klorofillok in vivo állapotaira

Míg az oldatokon mért abszorpciós szinképekből elsősorban a pigmentösszetételére tudunk következtetni, addig az alga sejteken mért in vivo abszorpciós szinképekből következtetni lehet a pigmentek membránbeli állapotára is. Éppen az in vitro és in vivo szinképek összevetéséből ismert, hogy a festék molekulák a plasztisz membránokban jórészt különböző asszociátumok, komplexek formájában vannak jelen (41). Minthogy az asszociátumok képzésében a zsírsav molekulák is résztvesznek (42), ezért logikusnak

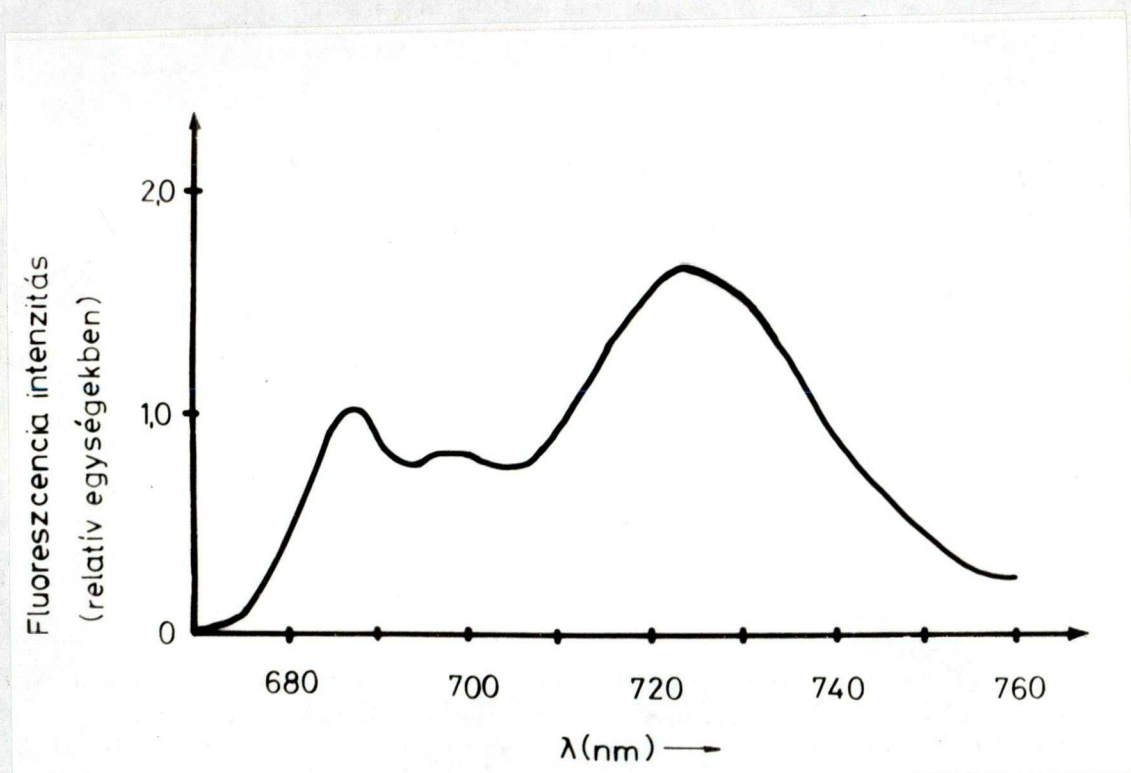
tűnt az az elgondolás, hogy a zsírsavhiányos sejtek in vivo abszorpciós spektrumában eltérést kell tapasztalnunk a normális sejtek spektrumához képest. Mérésünk során azonban ezt a különbséget nem tudtuk kimutatni; a ceruleinnel kezelt és kezeletlen alga kultúrák abszorpciós spektruma - a vörös tartományban - gyakorlatilag megegyezett (13. ábra).



13. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ cerulennel kezelt (---) *C. pyrenoidosa* tenyészetek abszorpciós spektruma
(Módszer: SzF-18 integráló gömbös spektrofotométer. Hőmérséklet: kb. 20°C , 1 cm-es küvetta, 0,310 extinkció 682 nm-nél)

Feltételeztük, hogy a pigment asszociátumokban a kezelést követő változás sokkal finomabb annál, semhogy egész

sejteken mért abszorpcióval kimutatható legyen. Ismeretes, hogy az abszorpciós méréseknél a lumineszcencia jellemzők mérése sokkal érzékenyebb módszer, ezért jól alkalmazható a kromofórokban bekövetkező kisebb változások nyomonkövetésére is. A lumineszcenciának különösen érzékeny módszere a mélyhőmérsékletű spektrofluorimetria. Az alábbi ábra a 77°K -ra lehűtött *C. pyrenoidosa* sejtek fluoreszcencia szinképét ábrázolja.



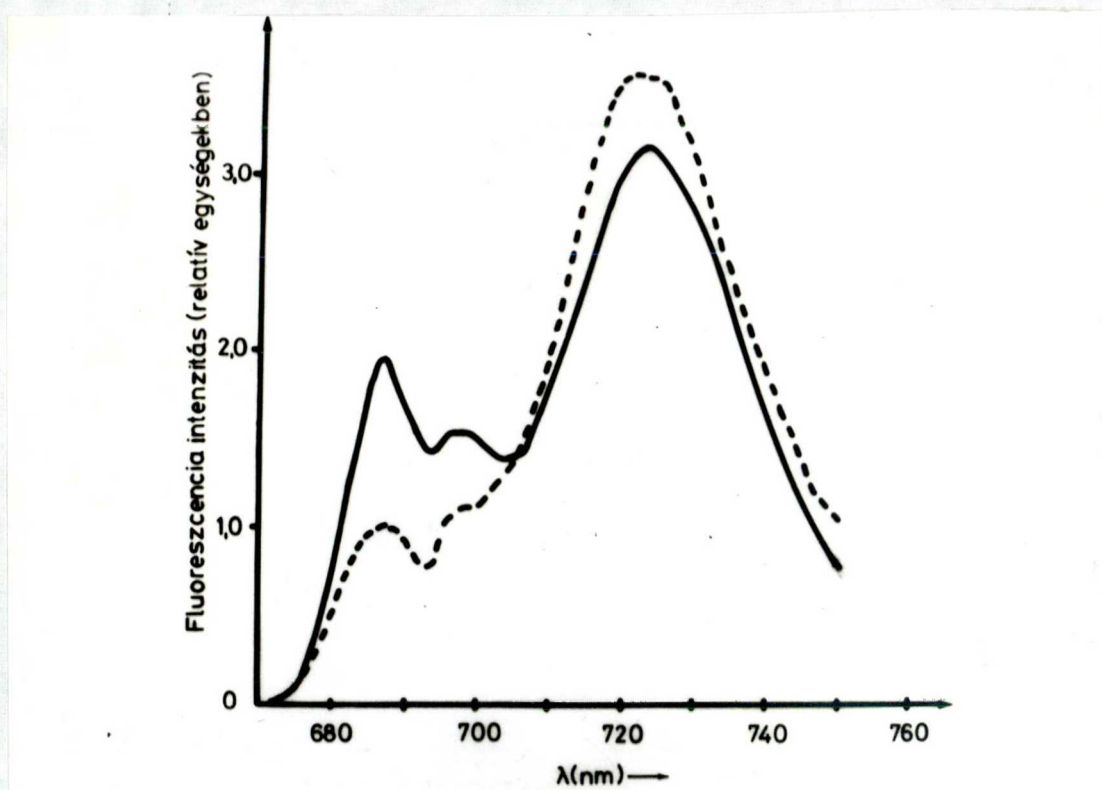
14. ábra. 77°K -ra lehűtött *C. pyrenoidosa* sejtek fluoreszcencia spektruma
(Műszer: Perkin-Elmer MPF-44A spektrofluoriméter
Gerjesztés: 480 nm. Reabszorpció $< 5\%$)

Az ábrán látható fluoreszcencia spektrumon 3 sávot lehet megkülönböztetni: 687 nm-nél (F 687), 700 nm-nél (F 700) és 724 nm-nél (F 724). E sávok klorofill-a molekuláktól



erednek, mivel a gerjesztett klorofill-b molekulákról klorofill-a molekulákra történő energiaátadás - még 77°K -on is - igen hatékony (43). Az egyes sávokat különböző klorofill-a formákkal azonosítják. Az egyes klorofill formák pigment asszociátumoknak tilakoid membránnal való integrálódását jelentik (44).

Míg az abszorpciós spektroszkópiai vizsgálatokkal nem



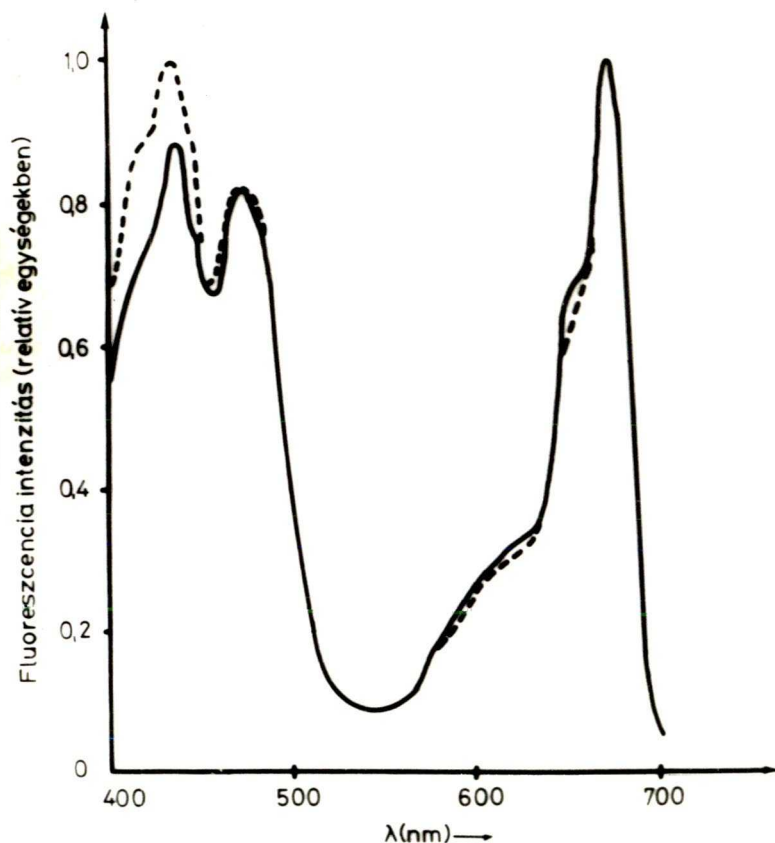
15. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ cerule-
ninnel kezelt *C. pyrenoidosa* sejtek 77°K -on
mért fluoreszcencia spektruma. A spektrumok
egységnyi területre normáltak
(Mérési körülmények: 1. 14. ábra)

tapasztaltunk jellemző változást a cerulenin-kezelés hatására, addig a mélyhőmérsékletű spektrofluorimetriai mérések alapján kitűnt, hogy a kezelés befolyásolja a klorofill formák kialakulását. A 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ cerulenin jelenlétében nevelt alga sejtek mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektrumában a hosszabb hullámhosszu - F 724 - sáv intenzívebbé vált (15. ábra). Páronként képezve a 3 sáv intenzitásának hányadosát, a következő eredményt kapjuk:

Kontroll:		
F 724/F 687=1,62	F 700/F 687=0,80	F 724/F 700=2,03
Cerulenines:		
F 724/F 687=3,60	F 700/F 687=1,11	F 724/F 700=3,24
$\frac{\text{Kontroll}(k)}{\text{Cerulenines}(c)} :$		
$F_k 724/F_c 724=0,89$	$F_k 700/F_c 700=1,31$	$F_k 687/F_c 687=1,95$

A pigmentanalízis alapján kitűnt, hogy a cerulenin hatására figyelemreméltó növekedés tapasztalható a sejtek karotinoid tartalmában. Ez alapján felmerülhet a gyanu, hogy a hosszabb hullámhosszu forma fluoreszcenciájának intenzívebbé válása esetleg a karotinoidokról való hatékonyabb energiaátadás következménye. Ennek ellenőrzésére célszerűnek látszott meghatározni a hosszú hullámu komponens fluoreszcencia gerjesztési szinképét. A 16. ábra a kezeletlen és a ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* sejtek 77°K -on mért

fluoreszcencia gerjesztési szinképét mutatja:



16. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (---) *C. pyrenoidosa* sejtek 77°K -on mért fluoreszcencia gerjesztési szinképe
(Műszer: Perkin-Elmer MPF-44A spektrofluoriméter)
(Megfigyelés: 730 nm)

Az ábráról látható, hogy jelentős különbség a spektrumok között elsősorban a klorofill-a molekulákra jellemző 435 nm körüli tartományban van, nincs viszont eltérés a karotinoidokra jellemző 500 nm körüli régióban. Ez alapján elmondható, hogy a cerulenin-kezelés hatására a klorofill-a

molekulák közötti energiaátadás változik meg; nem tapasztalható viszont eltérés a karotinoidokról a klorofill-a molekulákra történő energiaátadásban. Ebből arra következtethetünk, hogy a kezelés hatására megjelenő karotinoid többletnek elsősorban strukturális szerepe van, a fotoszintézis folyamatát a karotinoid többlet nem befolyásolja lényegesen.

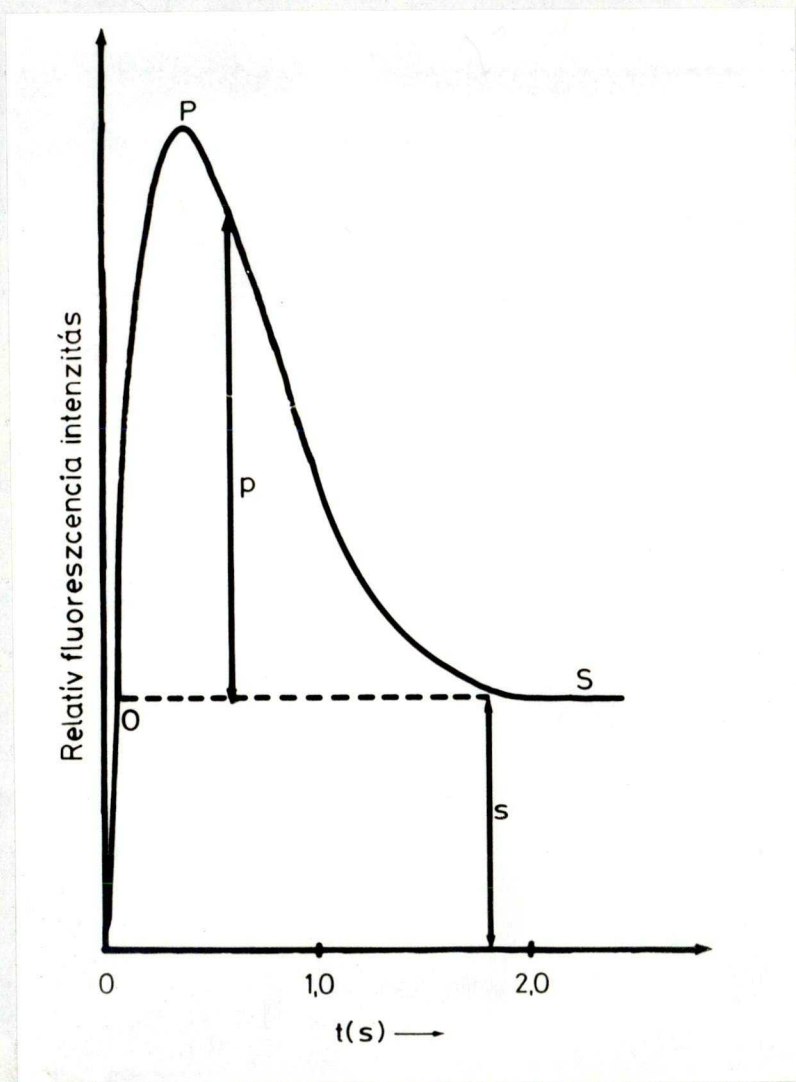
3. A lipoidhiány befolyása a Chlorella fotoszintetikus működésére

Az eddig tárgyalt paraméterek elsősorban a fotoszintézis strukturális oldalát vizsgálták. A következőkben néhány olyan jellemzőt kívánunk ismertetni, melyek közelebbi kapcsolatban vannak a fotoszintézis funkciójával.

a) A klorofill komplexek primér fényreakciójának kinetikája normális és lipoidhiányos sejteknél

Elsőként e jelenségek közül a *C. pyrenoidosa* fluoreszcencia indukcióját tárgyaljuk. (A jelenséget 1931-ben H. Kautsky fedezte fel, ezért ezt szokás Kautsky-effektusnak is nevezni.) Az effektus lényege az, hogy ha sötétbe adaptált fotoszintetizáló rendszereket állandó megvilágításnak tesszük ki, akkor a membránokba ágyazott klorofill-a molekulák fluoreszcencia intenzitása kezdetben jelentősen emelkedik, majd csökken, és egy bizonyos idő elteltével ál-

landó értéket vesz fel. A klorofill-a fluoreszcencia indukciót két csoportra szokták osztani: gyors (maximum néhány másodperces) és lassu (több perces) indukció (44). Az alábbiakban mi a *C. pyrenoidosa*-nak csak a gyors fluoreszcencia indukciós tulajdonságait tárgyaljuk. A következő ábra a *C. pyrenoidosa* általunk mért indukciós görbét mutatja.



17. ábra. A *C. pyrenoidosa* gyors indukciós görbéje (Gerjesztés: He-Ne gázlázerrel, 632,8 nm-es fényvel. Klorofill tartalom: kb. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Az indukciós görbe egyes szakaszait Lavorel (45) nyomán O, P és S betűkkel jelöltük; az O a kezdeti, a P a maximális, az S pedig a fluoreszcencia stacionárius szintjét jelenti. (Érdemes megemlíteni, hogy az O-P szakasz között Govindjee és munkatársai kimutattak egy visszahajlást is, melyet L-D-vel jelölték (46-48). E visszahajlást mi a mérések nagy többségében nem tapasztaltuk, ezért tipikus görbének a 17. ábrán látható görbét fogadtuk el, amely több szerző által leírtakhoz hasonló (44, 45, 82).)

Az indukció tanulmányozására számos modellt állítottak fel (45, 48-52), ezek közül az egyik legegyszerűbbet ismertetjük Lavorel (45) nyomán. Mint a 17. ábrán látható, a fluoreszcencia 2 fő részre osztható: egy konstans s nagyságú komponensre és egy változó részre, melynek nagysága p. Ez utóbbi komponens klorofill molekuláktól ered, és tükrözi e molekulák indukciós periódus alatti változásait. Közelebbről: a klorofill molekulák egyrésze olyan ChlP komplexet alkot, melyek fluoreszkálnak, de nem fotoaktívak, a p tulajdonképpen ezek relatív koncentrációját jelenti. A kép teljessé tételéhez még 2 komplexet kell feltételeznünk: egy nem-fluoreszkáló fotoaktív Chl0 és egy nem-fluoreszkáló, nem-fotoaktív ChlS komplexet. E három forma a következő sorrendben jelenik meg: Megvilágítás előtt a komplexek mindegyike Chl0 állapotban van. A fény bekapcsolása után a Chl0 fotokémiai úton ChlP-vé alakul és ez a forma felelős a fluoreszcencia gyors O-P emelkedéséért. A következő P-S átmenet lényegében egy termikus bimolekuláris folyamat, amely során a ChlP egy X⁺ anyaggal re-

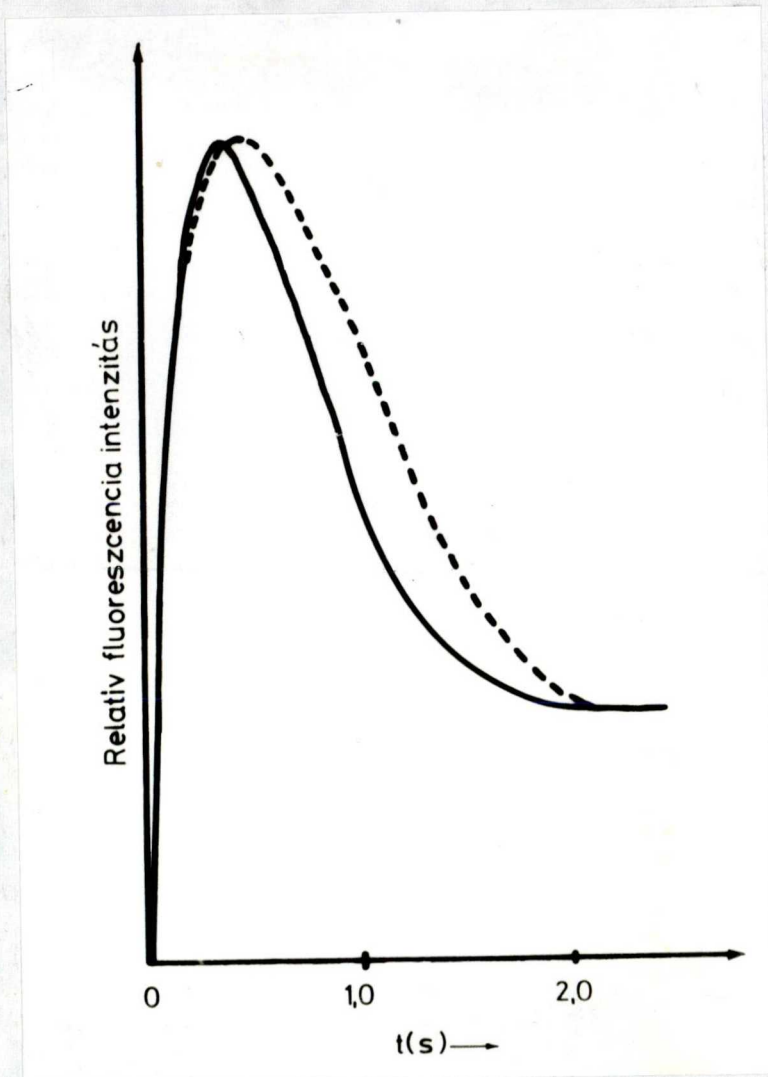
kombinálódik, melynek koncentrációja kezdetben elmarad a ChlP mögött, majd a P-S fázis végén kiegyenlítődik azzal. Az X' anyag keletkezésére a következő a feltevés: Az O-P fotokémiai fázis során a ChlO komplex ChlP-re és X-re disszociál, az X pedig a P-S szakasz során fokozatosan X'-vé alakul, illetve kombinálódik a ChlP komplexszel. Ez utóbbi reakció végeredménye a ChlS komplex. A ChlS képes ChlO-vá visszaalakulni, így a reakciókör zárul. Összefoglalva: a klorofill komplex a következő reakciókon megy át:



Rendszerint elmondhatjuk, hogy $k^{\#} \gg k_1$ és $k_2 \gg k_3$.

Az itt ismertetett modell nagyon általános; nem foglalkozik pl. az X és X' kémiai természetével, és a disszociáció fogalmát sem kell szigorúan kémiaiilag értelmeznünk, elegendő csupán az X jelenlétét tudomásul vennünk. A későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy a Lavelle-modellben szereplő ChlP és ChlS tulajdonképpen a PSII elsődleges elektronakceptorának (Q) redukált és oxidált formájával azonosítható, így a fluoreszcencia indukció tanulmányozásával erről a komponensről nyerhetünk információt.

Ha megvizsgáljuk egy 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* tenyészet indukciós görbáját, a következő képet kapjuk:



18. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (— —) *C. pyrenoidosa* fluoreszcencia indukciós görbéje (Mérési körülmények: l. 17. ábra)

A 18. ábráról látható, hogy a ceruleninnel kezelt tenyészet kb. 0,15 s-mal hosszabb időt igényel a P állapot eléréséhez, mint a kontroll sejtek; terminológiánk szerint a $\text{ChlO} \rightarrow \text{ChlP} + \text{X}$ disszociáció akadályozott. Kérdés, hogy ta-

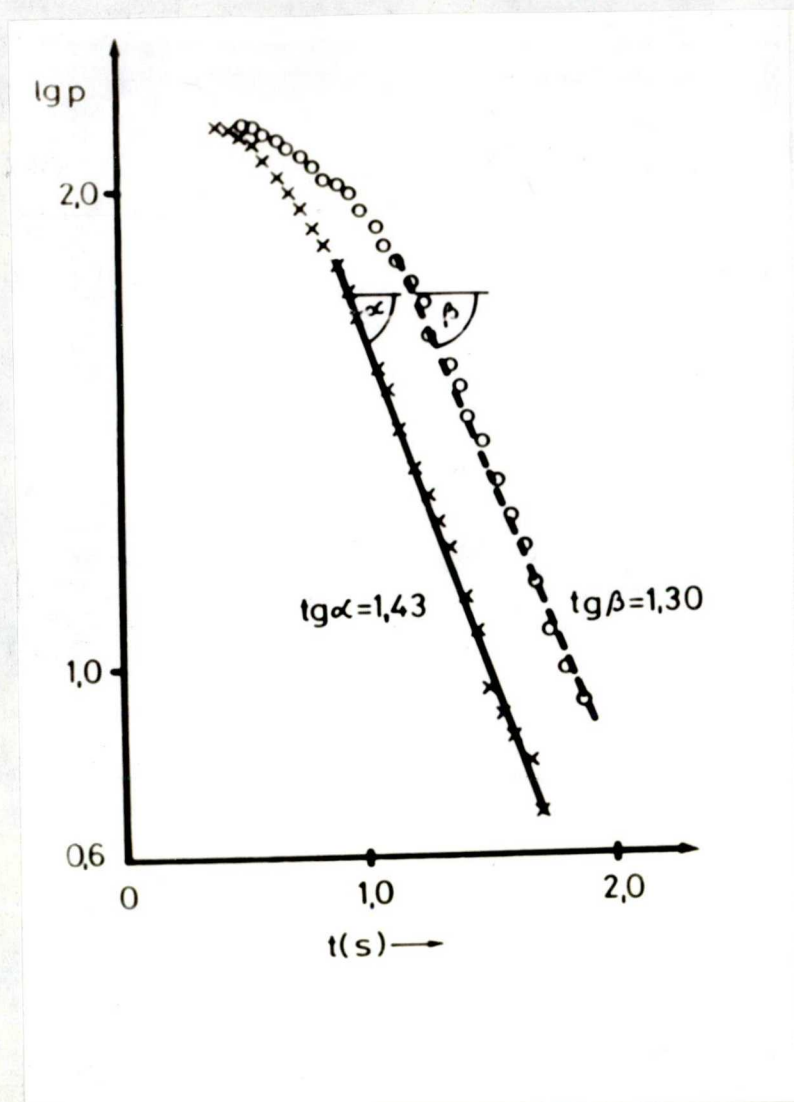
pasztalható-e eltérés a P-S szakaszban is, azaz különbözik-e a k_2 reakciósebességi állandó a kezelt és a nem-kezelt sejtekénél. Az indukciós görbe eredeti alakjából ez nem állapítható meg egyértelműen, ezért célszerű a görbét egyszerűbb formára hozni. Erre Lavorel (45) a p következő formula szerinti linearizálását javasolja:

$$\frac{1}{p} = A + Bt ,$$

ahol A és B állandók, t pedig az idő. E formula azonban csak a P-S fázis utolsó szakaszát írja le kielégítően, ezért mi ehelyett - Láng és munkatársaihoz (53) hasonlóan - a következő formulával dolgoztunk:

$$\lg p = -kt + a$$

A k paraméter megadja az egyenes lehajlásának mértékét, míg az "a" az egyenes kezdeti értékét mutatja. A 19. ábra a tenyészetek indukciós görbéjének $\lg p$ értékeit mutatja az idő függvényében. Az ábra szerint az indukciós görbék P-S szakaszainak logaritmusa közel azonos iránytangensű egyeneseket ad. Ezek szerint az indukciós görbék ezen szakasza mind a kontroll, mind a ceruleninnel kezelt mintáknál azonos kinetikát mutat. Azaz - eddigi terminológiánkkal - a $\text{ChIP} + \text{X}' \rightarrow \text{ChIS}$ reakciósebességben különbség nem mutatható ki a kezelt és kezeletlen sejtek között.



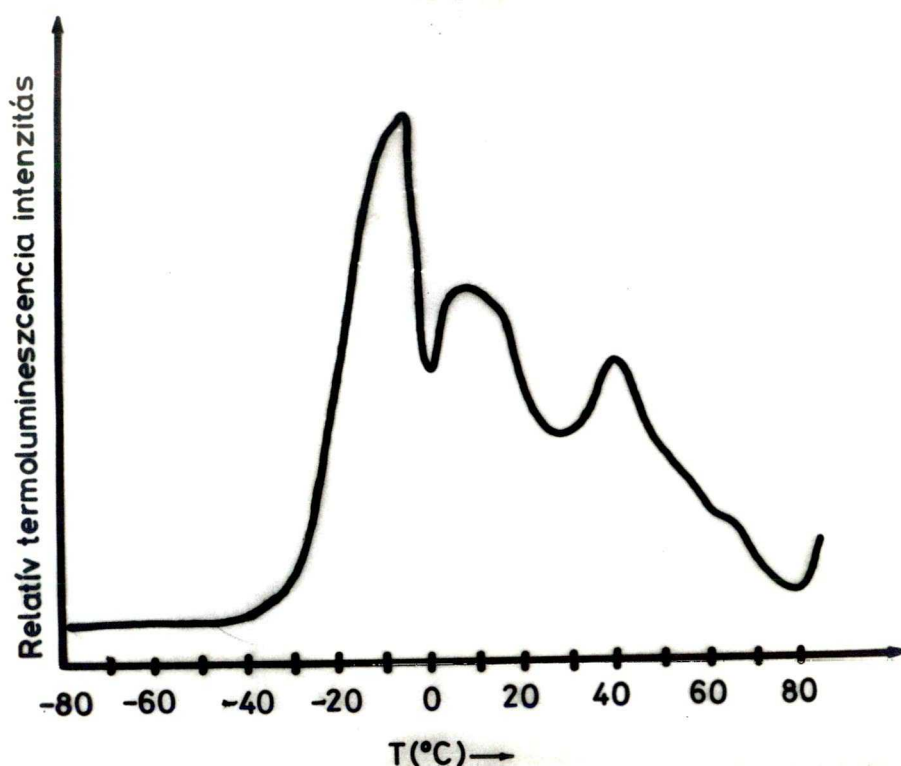
19. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (- - -) *C. pyrenoidosa* fluoreszcencia indukciós görbéjének $\lg p$ értékei az idő függvényében

b) A klorofill komplexek primér fényreakciójával
ellentétes folyamatok néhány tulajdonsága
lipoidhiányos sejteknél

A fenti reakciót további két módszerrel, - termolumineszcenciával és késleltetett lumineszcenciával - is tanulmányoztuk. E jelenségek azokkal a centrumokkal állnak

szoros kapcsolatban, melyek a gerjesztési energia végső állomásai a fotoszintetikus egységekben. Ezeknek az energiacsapdáknek az állapota jól tükrözi a fotoszintetizáló membránok változásait, ezért tanulmányozásuk felvilágosítást nyújt a membrán egyes tulajdonságainak a fotoszintézis elsődleges folyamataiban betöltött szerepéről. A két alkalmazott módszer közül először a termolumineszcenciával foglalkozunk.

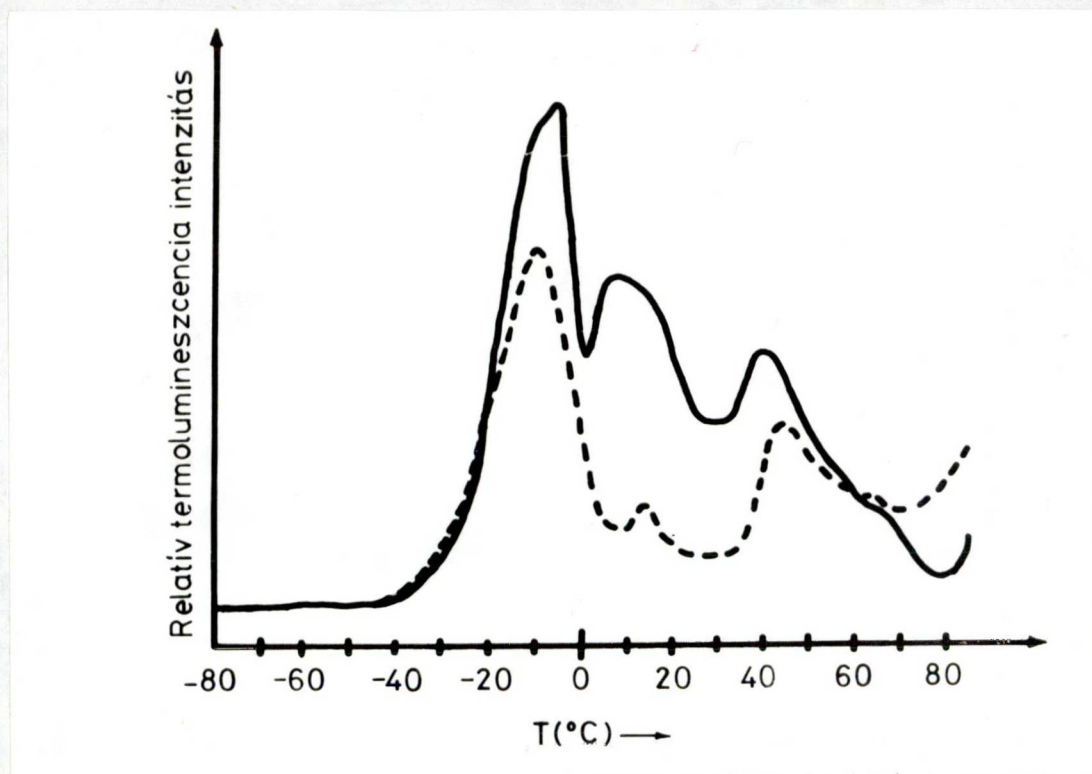
A termolumineszcencia lényege az, hogy előzetesen megvilágított és alacsonyabb hőmérsékletre lehűtött fotoszintetizáló szervezetek edtétben történő felmelegítésükkor fényt bocsátanak ki (55). A jelenleg legelfogadottabb elmélet szerint a termolumineszcencia a fotoszintetikus reakciócentrumokban lejátszódó primer fotokémiai reakciók közvetlen megfordításából ered, segítségével meghatározható a fordított reakcióhoz szükséges aktiválási energia is (56-58). A 20. ábra a *C. pyrenoidosa* sejtek termolumineszcencia görbáját mutatja. A *C. pyrenoidosa* termolumineszcencia görbáján 3 csúcsot és 2 vállat tudunk megkülönböztetni: -9, -5, +8, +17 és +40°C-nál. Ezek az adatok jól egyeznek az irodalmi adatokkal (59, 71, 72). (A kisebb eltérések - amelyek elsősorban az egyes sávok különböző intenzitásában jelentkeznek - az eltérő mérési körülményeknek - pl. eltérő megvilágítási erősségeknek és időeknek, eltérő lehűtési sebességeknek, stb. - tudhatók be. Ezek megfelelő megválasztásával azonban sikeresen tudtuk reprodukálni az egyes irodalmi eredményeket.) A cerulenin-



20. ábra. *C. pyrenoidosa* szuszpenzió termolumineszcencia görbéje
(Műszer: Az SZBK Növényélettani Intézetében összeállított berendezés)
(Megvilágítás: 20°C-ról -80°C-ra történt hűtés során folyamatosan 20 W/m² intenzitású fehér fénnel.
Felfűtés: 10°/min
Klorofill-tartalom: kb. 100 µg/ml)

nel kezelt alga szuszpenziók termolumineszcenciája jellemző eltérést mutat a kontrollhoz képest (21. ábra). Az ábráról látható, hogy a cerulenin-kezelés csökkentette a -5°C-os és a nagymértékben összeolvadó 8 és 17°C-os sávok intenzitásait. (Ugyanakkor a 8°C-os sáv 13°C-ra, a 17°C-os sáv 20°C-ra tolódott el.) A 40°C-os sáv magassága is csökkent és maximumhelye 44°C-ra tolódott el.

A termolumineszcencia görbe ilyen egyszerűsödése lehetőséget nyújt arra, hogy - ha nem is minden sávhoz - meghatározzuk az aktiválási energiát. Erre két eljárás ismeretes:



21. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (---) *C. pyrenoidosa* tenyészet termolumineszcencia görbéje
(Mérési körülmények: 1. 20. ábránál)

Az egyik a jól ismert arrheniusi grafikus módszer, a másik pedig a Luriš és Bertsch (57) által leírt számítási módszer. Az első módszer lényege az a gondolat, hogy a fűtés során kilépő termolumineszcencia fény intenzitása arányos a klorofill molekulákat ujragerjesztő reakció mértékével. Felírható a következő differenciálegyenlet:

$$I \cdot L \cdot \frac{dn}{dt} = n \cdot s \cdot e^{-\frac{E}{kT}},$$

ahol "I" a lumineszcencia intenzitása, "L" arányossági tényező, "n" a "t" időben az "E" mélységű csapdába jutott elektronok száma, "k" Boltzmann állandó, "s" pedig az u.n. frekvencia faktor. A fenti egyenletből

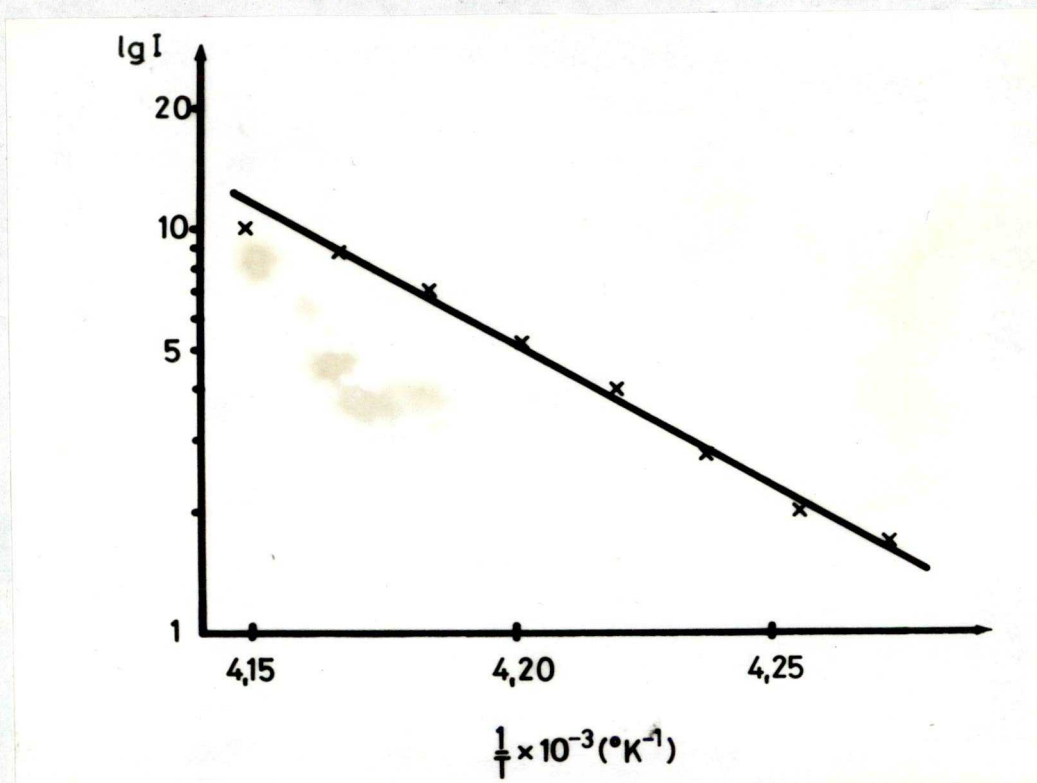
$$\ln I = -E/kT + \ln C.n.s$$

Látható, hogy ábrázolva a $\log I$ értékeket az $1/T$ függvényében a kapott egyenes meredeksége $E/2,3026.k.$

A Lurie-Bertsch módszer egyszerűbb; az E aktiválási energia megadható a következő formában:

$$E = \frac{1,461.k.T_{1/2} \cdot T_{\max}}{T_{\max} - T_{1/2}},$$

ahol $T_{1/2}$ az a hőmérséklet, amelynél egy sáv emelkedő szakasza eléri a sáv maximumának a felét, $T_{\max}$ pedig a sáv maximumához tartozó hőmérsékletérték. Megjegyzendő, hogy mindkét eljárás csak "tiszt", egy komponensű sávokra alkalmazható. Esetünkben ilyen egy komponensű sávnak csak a cerulenin-kezelés után kapott -10°C -os sáv mondható, ezért az aktiválási energiát csupán erre a sávra tudtuk meghatározni. (Kísérletet tettünk arra, hogy a spektrumokat a Lurie és Bertsch (57) által leírt módon Boltzmann eloszlású komponensekre bontsuk és meghatározzuk a komponensekhez tartozó aktiválási energiákat. Próbálkozásunk azonban a sávok nagyfoku és többszörös átfedése miatt nem járt sikerrel.) A 22. ábra az említett sáv Arrhenius-egyenesét mutatja. Az egyenes iránytangenséből számított aktiválási energia $0,79 \text{ eV}$ -nak adódott. A Lurie-Bertsch módszert alkalmazva $E = 0,76 \text{ eV}$.



22. ábra. A ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* szuszpenzió -10°C -os termolumineszcencia sávjának Arrhenius-egyenese

Az aktiválási energia ismeretében az

$$s = \frac{B \cdot E \cdot e^{E/kT_{\max}}}{k \cdot T_{\max}^2}$$

összefüggésből megadható az s frekvencia faktor is (57).

(B : az időegység alatt bekövetkező hőmérséklet növekedés)

Feltételezve, hogy a sávot eredményező "back-reakció" elsőrendű kinetikát követ, megadható a sávhoz tartozó lumineszcencia τ csillapodási ideje is (57):

$$\tau = \frac{e^{E/k \cdot T_{\max}} \cdot \ln 2}{s}$$

A -10°C -os sáv frekvencia faktorára - a két módszerrel kapott aktiválási energiák átlagával, $0,775\text{ eV}$ -tal számolva - $1,3 \cdot 10^{14}\text{ s}^{-1}$ -t kaptunk, a sávhoz tartozó lumineszcencia csillapodási ideje pedig $3,2 \cdot 10^{-2}\text{ s}$ -nak adódott.

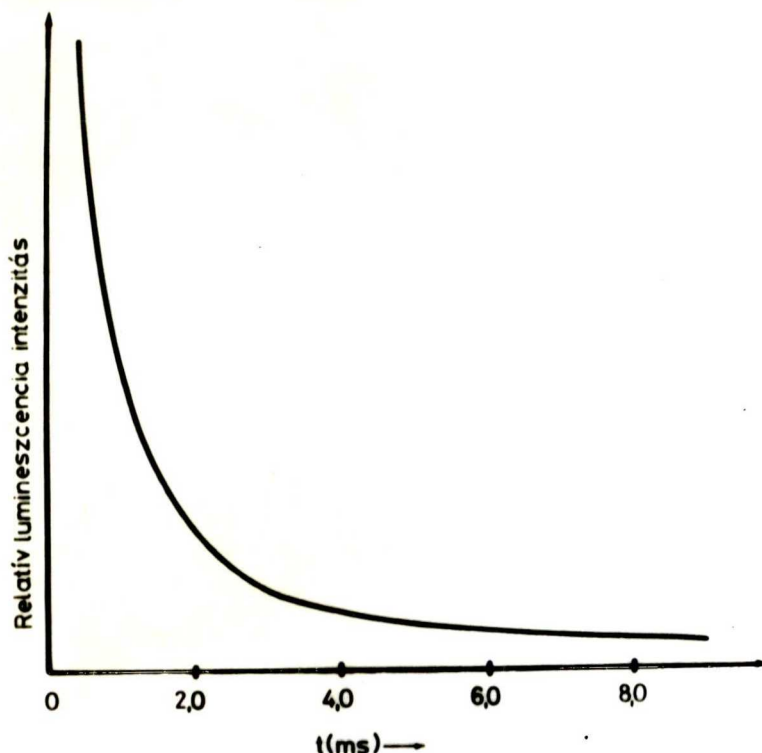
Az energiacsapdák vizsgálatának másik módszerét, a késleltetett lumineszcenciát Strehler és Arnold irták le először (60). Tapasztalataink szerint a fotoszintetizáló szervezetek - algák és magasabbrendű növények - akkor is képesek fluoreszcencia fény kibocsájtására, amikor megvilágításukat megszüntetik. (Ez a fény keletkezési mechanizmusában és spektrális tulajdonságában jelentősen eltér a foszforeszcenciától, így indokolt megkülönböztetni attól.) A megvilágítás megszüntetése után a fluoreszcencia intenzitás nem marad állandó; fokozatosan esükkén (23. ábra). (A esükkénés ellenére a késleltetett lumineszcencia több secundummal a megvilágítás megszüntetése után is megfigyelhető.) A millisekundumos tartományban felvett késleltetett lumineszcencia görbék elemzése azt mutatta, hogy a fluoreszcencia kinetikája legjobban exponenciális tagok összegeként írható le (61, 62, 63):

$$f(t) = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \dots + A_n \cdot e^{-\frac{t}{\tau_n}}$$

A_1, A_n : állandók, a komponensek kezdeti fluoreszcencia intenzitásai

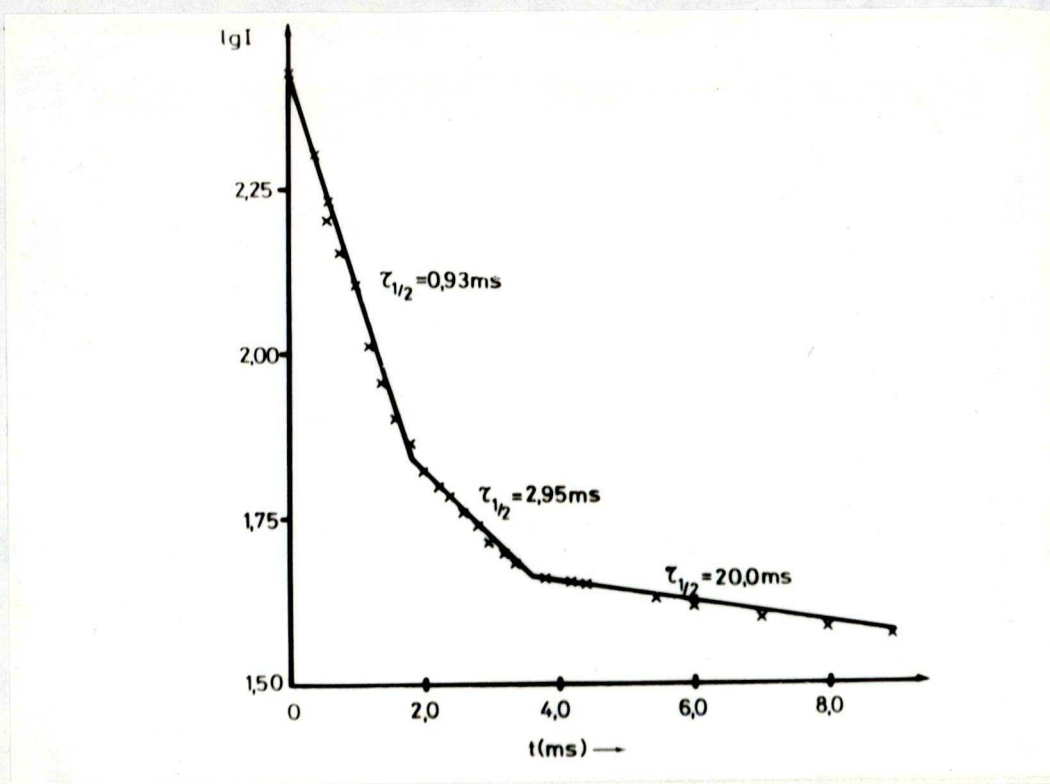
t : idő

τ_1, τ_n : a komponensek időállandói



23. ábra. *C. pyrenoidosa* szuszpenzió késleltetett lumineszcenciája
(Műszer: Az SZBK Növényélettani Intézetében összeállított berendezés
Megvilágítás: 10 W/m² intenzitású fehér fény.
Hőmérséklet: kb. 20 °C. Klorofill tartalom: kb. 10 µg/ml)

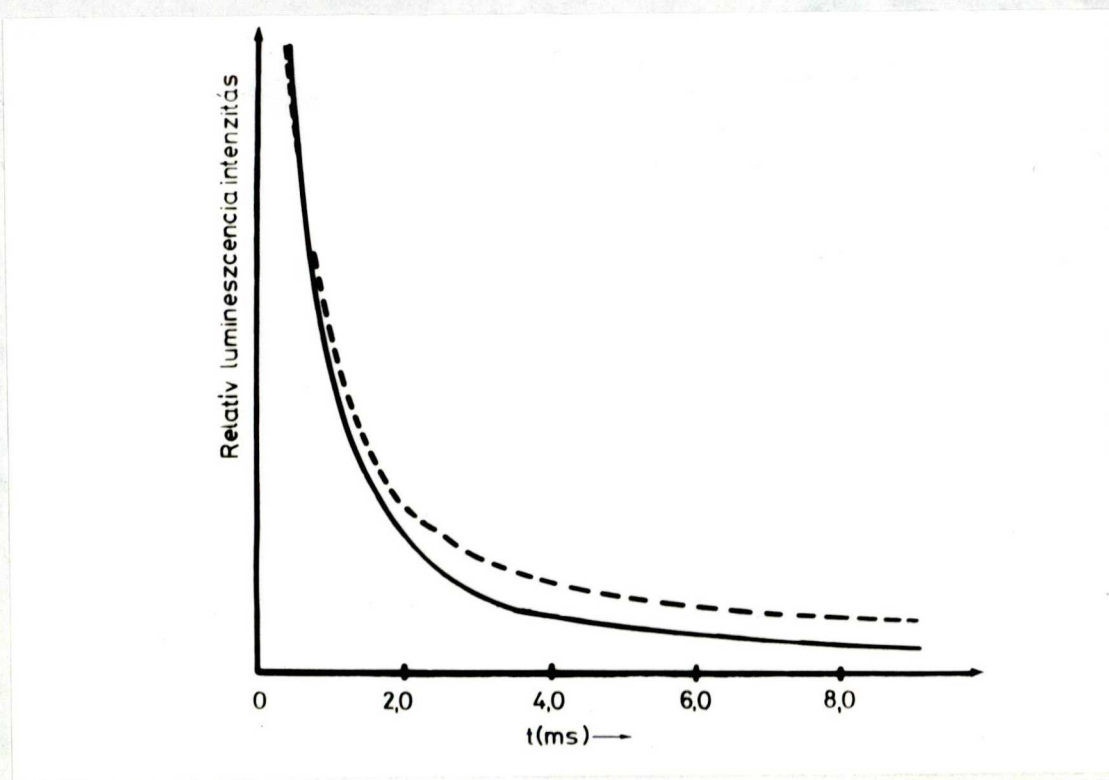
Az egyes komponenseket a τ_n időállandóval szokás jellemezni. Mi e paraméter meghatározására a reakciókinetikából jól ismert grafikus eljárást alkalmaztuk (64). Ábrázolva a késleltetett lumineszcencia intenzitásának logaritmusát az idő függvényében a következő eredményt kaptuk:



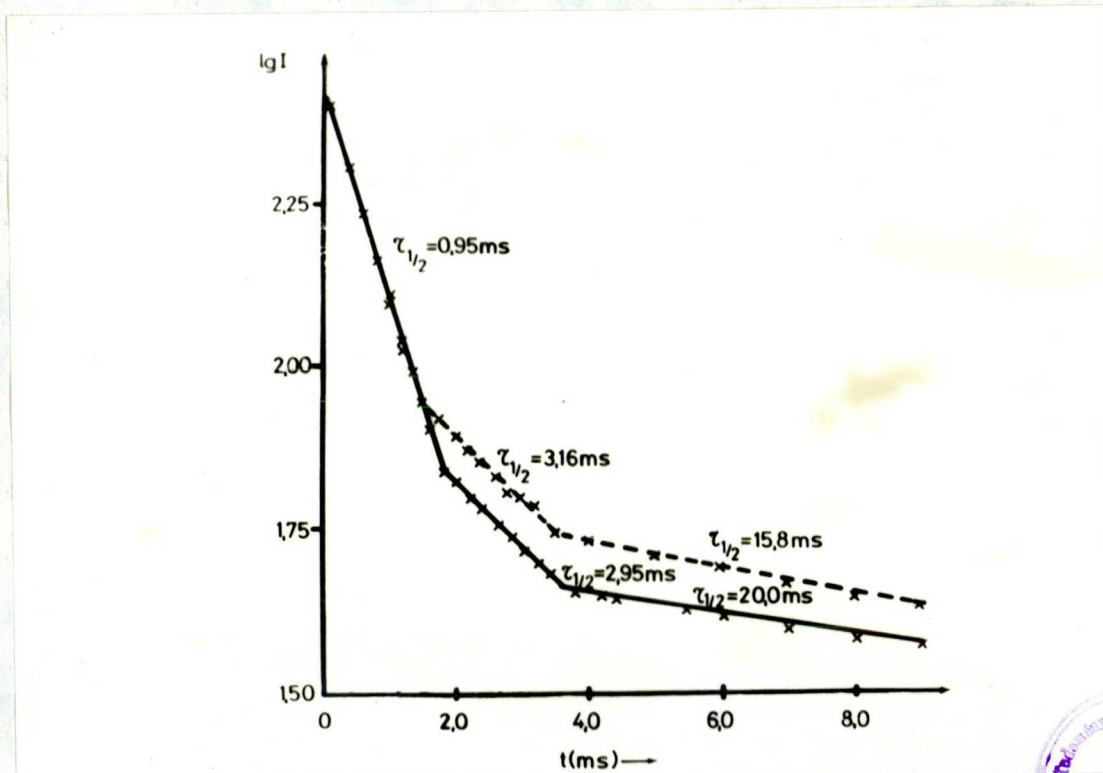
24. ábra. A *C. pyrenoidosa* késleltetett lumineszcenciájának szemilogaritmikus ábrázolása

Az ábráról látható, hogy a fluoreszcencia intenzitások logaritmusai három eltérő iránytangensű egyenesre illeszthetők. Ez alapján a *C. pyrenoidosa* késleltetett lumineszcenciája a millisecundumos tartományban három komponensre bontható. E komponensek időállandója 0,93 ms, 2,95 ms és 20,0 ms-nak adódott.

A 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* késleltetett lumineszcenciája nem mutat lényeges eltérést a kontrollhoz képest (25. ábra). A görbét elemezve megtalálható a kontrollnál meglevő három komponens (26. ábra). Az egyenesek iránytangenséből meghatározott időállandók 0,95 ms, 3,16 ms és 15,8 ms-nak adódtak.



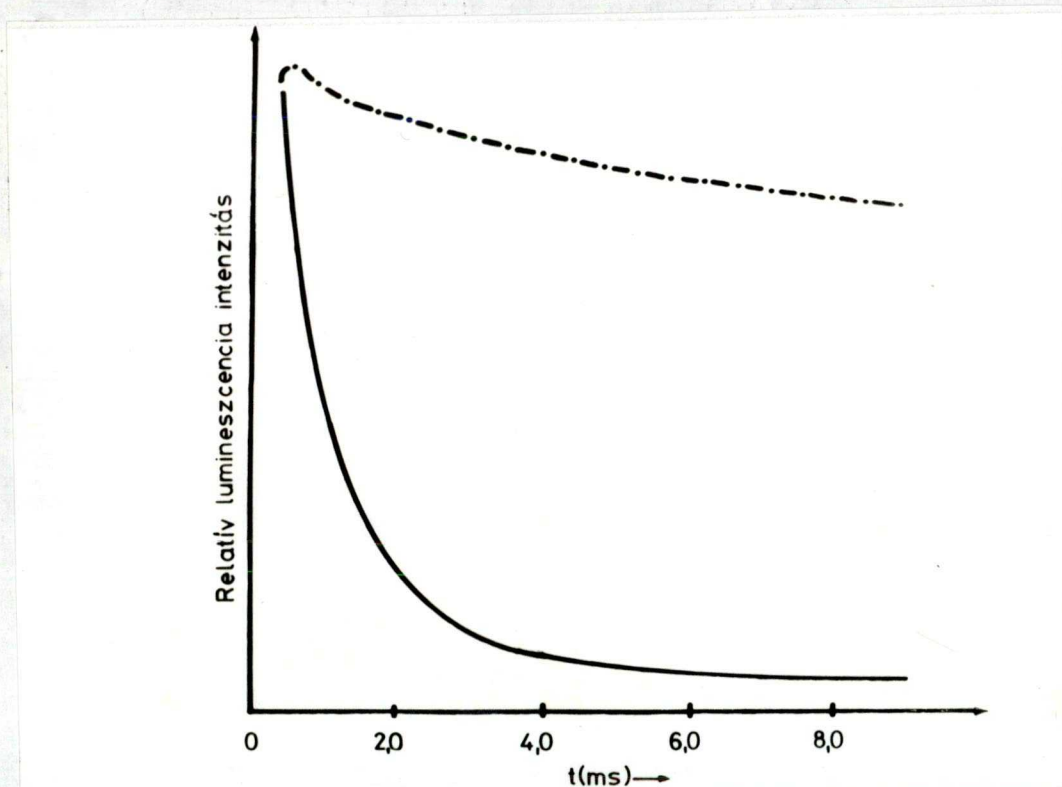
25. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (---) *C. pyrenoidosa* szuszpenziók késleltetett lumineszcenciája (Mérési körülmények: 1. 23. ábránál)



26. ábra. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt (---) *C. pyrenoidosa* szuszpenziók késleltetett lumineszcenciájának szemilogaritmikus ábrázolása

c) A. 2. fotokémiai rendszer működése normális és lipoidhiányos sejtekénél

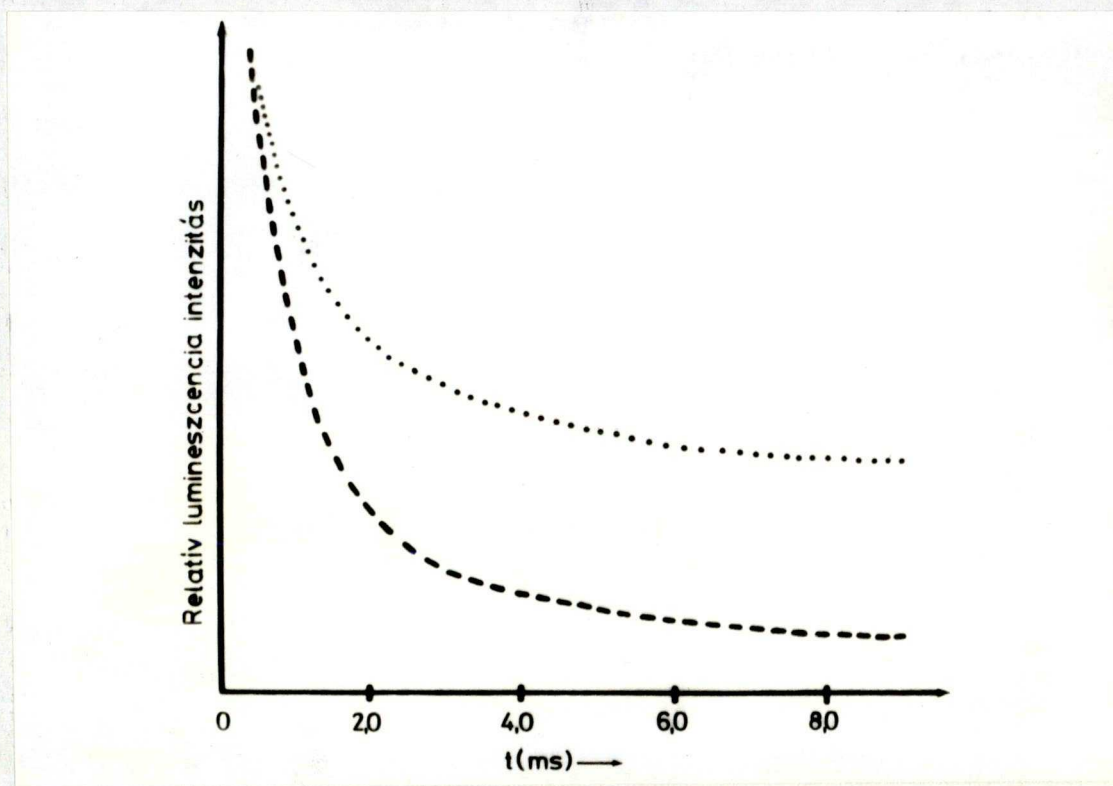
A késleltetett lumineszcencia egyes komponenseinek és a fotoszintémák különböző tagjainak egymáshoz rendelésére általánosan elterjedtek a különféle inhibitorok jelenlétében végzett vizsgálatok. Az egyik legáltalánosabban használt gátlószer a DCMU (3-(3,4-diklórfenil) - 1,1-dimetil-urea), amely az elsődlegesről (Q-ról) a másodlagos elektron akceptorra (plasztokinonra) történő elektronvándorlást akadályozza meg (78). Tapasztalatok szerint a kis koncentrációban alkalmazott DCMU meggátolja a késleltetett lumineszcencia gyors komponenseinek megjelenését; a görbe csak egy



27. ábra. *C. pyrenoidosa* tenyészet késleltetett lumineszcenciája 10 μ M DCMU jelenlétében (---.).
(—: DCMU nélküli kontroll)
(Mérési körülmények: 1. 23. ábránál)

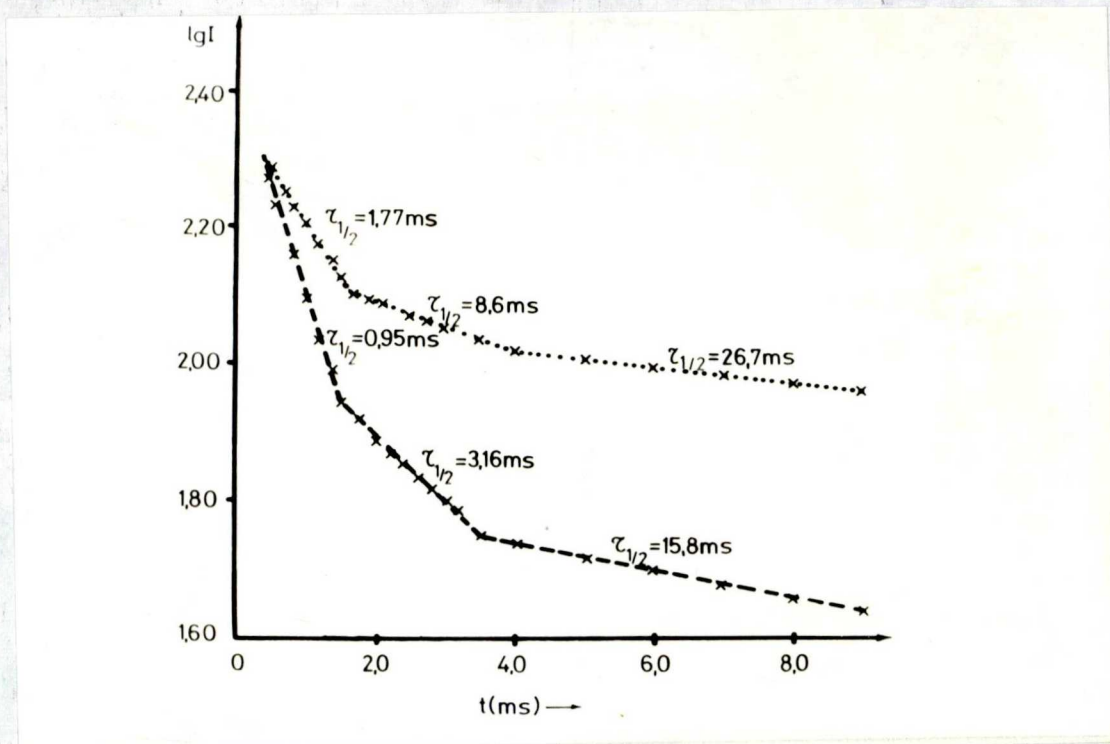
igen lassan csökkenő komponensből áll (65-67). Ezt tapasztaltuk mi is, ha a kontroll *C. pyrenoidosa* tenyészetet $10\ \mu\text{M}$ DCMU-val kezeltük (27. ábra).

A lassu komponens időállandójára $41,7\ \text{ms}$ -ot kaptunk. Érdekes módon a ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* sejtek nem mutattak jelentős DCMU szenzitivitást (28. ábra).



28. ábra. 72 órán át $22,5\ \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* tenyészet késleltetett lumineszcenciája $10\ \mu\text{M}$ DCMU jelenlétében (. . .). (- - -: DCMU nélküli ceruleninnel kezelt minta) (Mérési körülmények: 1. 23. ábránál)

A késleltetett lumineszcenciában jól kimutatható a három komponens (29. ábra). A DCMU jelenlétére csak a kb. megduplázódott időállandók utalnak; ezek értékei rendre $1,77\ \text{ms}$, $8,60\ \text{ms}$ és $26,7\ \text{ms}$.



29. ábra. 72 órán át $22,5 \mu\text{M}$ ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* tenyészet késleltetett lumineszcenciája $10 \mu\text{M}$ DCMU jelenlétében (. . .). (- - -: DCMU nélküli ceruleninnel kezelt minta) Szemilogaritmikus ábrázolás

A késleltetett lumineszcenciás mérések eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a ceruleninnel kezelt *C. pyrenoidosa* algák is mutatnak késleltetett lumineszcenciát, és e lumineszcencia kinetikája a ms-os tartományban nem tér el jelentősen a nem-kezelt sejtektől. Érdekes megfigyelés továbbá, hogy a ceruleninnel kezelt sejtek késleltetett lumineszcenciájára a DCMU csak kismértékben hat.

Mivel a késleltetett lumineszcencia igen szoros kapcsolatban van a szervezetek O_2 -fejlesztő képességével (65, 68), ezért a fenti megfigyelésből arra lehet következtetni, hogy

a ceruleninnel kezelt algák O_2 -fejlesztése nem tér el jelentősen a kezeletlen sejtektől, továbbá O_2 -fejlesztésük nagymértékben DCMU-inszenzitív. E következtetés helyességét kísérletesen közvetlenül is ellenőriztük. A következő eredményt kaptuk:

C. pyrenoidosa	Sötét légzés	O_2 -termelés fényre	Netto fotoszintetikus O_2 -termelés
	$\mu M O_2 / \mu M$ klorofill . óra		
Kontroll	1,064	5,119	6,183
Kontroll+DCMU	Nem	mérhető	
Cerulenin-kezelt	1,103	5,769	6,872
" +DCMU	2,340	4,146	6,486

8. táblázat. Kezeletlen és 72 órán át $22,5 \mu M$ ceruleninnel kezelt C. pyrenoidosa tenyészetek O_2 -evolúciójának összehasonlítása
(Műszer: Clark-elektroda. A méréseket az SZBK Növényélettani Intézetében és az ELTE Növényélettani Tanszékén végeztük)

A táblázatból látható, hogy a ceruleninnel kezelt algák netto fotoszintetikus O_2 -termelése nem tér el lényegesen a kezeletlen sejtektől. Igazolódott a kéleltetett lumineszcencia alapján adódó következtetésünk is: a ceruleninnel kezelt sejtek netto fotoszintetikus O_2 -termelése DCMU-inszenzitív. Ez az érzéketlenség azonban nem teljes; látható, hogy a DCMU a látszólagos O_2 -termelést kb. 30 %-kal csökkentette, amit viszont a DCMU jelenlétében meg-növekedett sötét légzés - a számítás szempontjából - kom-penzál.



III. AZ EREDMÉNYEKBŐL LEVONHATÓ NÉHÁNY KÖVETKEZTETÉS

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a cerulenin-kezelés hatására bekövetkezett lipoid-hiány a sejtek számos jellemzőjét befolyásolja, ugyanakkor egyeseket nem változtat meg lényegesen. Érdekes, hogy a kezelés jelentősebb befolyást elsősorban a sejtek életműködésében okoz, a szerkezetben főleg szupramolekuláris szinten okoz változást.

Az elektronmikroszkópos felvételeken a membrán - és pirenoid fragmentáció aránylag könnyen érthető. Bár a pirenoid szemese pontos kémiai összetétele még nem ismert, annyi bizonyos, hogy felépítésében zsírsavak is résztvesznek (73). Ezek hiánya szükségképpen a szerkezet megbomlásához vezet. Hasonló a helyzet a plasztisz membránok esetében is. Ez utóbbiaknál azonban a zsírsavakon kívül figyelembe kell vennünk a karotinoidokat is mint membránalkotókat. Láttuk, hogy a cerulenin-kezelés hatására a sejtek karotinoid tartalma megnőtt. A zsírsavszintézis biokémiai folyamata alapján (1. 1. ábra) ez könnyen érthető, mivel - kissé leegyszerűsítve - arról van szó, hogy a cerulenin-kezeléssel a biokémiai reakciókat a zsírsav szintézis felől a karotinoid szintézis felé tolhatjuk el. A karotinoidok viszont lipoidszerűségük és membrán stabilizáló tulajdonságuk (74) révén bizonyos mértékig kompenzálhatják a zsírsavhiányt. Ez lehet az oka annak is, hogy a kezelt és kezeletlen sejtek abszorpciós spektrumaiban és ESR jelében jellemző különbséget nem tudtunk kimutatni.

A karotinoidek strukturális szerepét világítja meg a fluoreszcencia gerjesztési szinkrópekből kapott eredmény, amely szerint a lipoid-hiányos sejtek karotinoid többlete az energiaátadást nem befolyásolja, tehát a megnövekedett hosszuhullámú fluoreszcencia csakis strukturális okokra vezethető vissza.

Egyéb lumineszcenciás mérések ugyanis azt mutatják, hogy a karotinoidek nem képesek teljes mértékben fenn tartani a membránintegritást. Ez a körülmény különösen élesen jelentkezik a mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektrumokban. A hosszabb hullámú (F724) formák megnövekedése - közel azonos klorofill-a tartalom mellett - egyértelműen a membrán normális szerkezetének megváltozására utal. Ezt a megállapítást alátámasztják a termolumineszcenciás görbékből kapott különbségek is. Mint láttuk, a különbség elsősorban a +10°C és +20°C körüli komponensek redukcióját jelentette. E komponenseket számos szerző (57, 75-77) a PSII-höz tartozó elektrontranszport láncsal hozza kapcsolatba.

A fluoreszcencia indukciós mérések is azt igazolják, hogy a cerulenin-kezelés a PSII elektrontranszport lánc működését befolyásolja; az elsődleges akceptor (Q) redukciója akadályozott, reoxidációjának kinetikája viszont nem tér el a kontrolltól. Ez arra utal, hogy a Q érzékeny a cerulenin-kezelést követő zsírsavhiányra, (feltehetően normális körülmények között a membrán lipoid fázisába ágyazottan fordul elő), viszont a Q⁻ és az azt közvetlenül

Visszaoxidáló másodlagos elektron akceptor közti szoros kapcsolat megmarad. A kezelt és kezeletlen mintákon mért reoxidáció kinetikájának azonosságából következtetve a cerulenin-kezelés nem befolyásolja lényegesen a vissza-oxidáló rendszer távolabbi tagjainak integritását sem.

Ez a következtetés módot ad arra is, hogy megmagyarázzuk a ceruleninnel kezelt minták késleltetett lumineszcenciájának és O_2 -fejlesztésének DCMU-inszenzitívását. Eszerint a zsírsavhiányos membránokban a Q olyan környezetbe kerül, ahol a DCMU nem képes hozzáférni. Meg kell jegyeznünk, hogy a fenti - szerintünk legvalószínűbb - magyarázaton kívül a jelenség másképpen is értelmezhető. Feltételezhető pl., hogy a cerulenin-kezelés új reakció utakat nyit meg, de elfogadható magyarázat adható akkor is, ha nem két, hanem három fényreakciót feltételezünk, melyek közül az egyik a normális sejtekben is DCMU-inszenzitív (79). Ugyancsak értelmezhető a DCMU-inszenzitívítás akkor, ha feltételezzük, hogy az elsődleges akceptort olyan réteg burkolja, amely a DCMU-érzékenységet felelős; normális körülmények között ez az anyag nem gátolja meg a DCMU-t hatása kifejtésében, a réteg szerkezetének megváltozása esetén viszont a DCMU-gátlás elmarad (80, 81). Ezek a feltételezések további vizsgálatokat igényelnek.

E legfőbb megállapításokon kívül fontosnak tartjuk azokat az eredményeket, melyek utat mutatnak a téma tovább-

fejlesztéséhez, részletesebb kidolgozásához. A C. pyrenoidosa szaporodásának tanulmányozásából, valamint a spinjelzett zsírsavak ESR-spektrumának vizsgálatából kitűnik, hogy a sejtek képesek felvenni és felhasználni a külsőleg adagolt zsírsavakat. Ez a tény reális lehetőséget nyújt in vivo membrán rekonstitúciós kísérletek elvégzéséhez, a membránokban előforduló zsírsavak szerepének mélyebb értelmezéséhez.

Munkánk során a lipoidok szerepét a lehető legtöbb oldalról igyekeztünk megvizsgálni, ez számos olyan anyag, eljárás és technika felhasználását jelentette, melyek szűkebb munkahelyemen, a JATE Biofizikai Tanszékén nem álltak rendelkezésünkre. Szerencsére több intézet készségesen támogatta munkánkat, segítségüknek nagy része van munkánk eredményességében.

Külön köszönettel tartozom dr Szalay László egyetemi tanárnak, a JATE Biofizikai Tanszék vezetőjének és dr Lehoczki Endre tudományos főmunkatársának munkám irányításáért.

Megköszönöm dr Faludiné Dániel Ágnes címzetes egyetemi tanárnak, az SZBK Növényélettani Intézet vezetőjének támogatását, valamint munkatársainak - elsősorban dr Demeter Sándor és dr Horváth Gábor tudományos főmunkatársaknak - a termolumineszcenciás, késleltetett lumineszcenciás és

O_2 evolúciós mérésekhez nyújtott segítséget.

Köszönöm dr Wanda Leyko egyetemi tanárnak, a Łódzi Egyetem Biokémiai és Biofizikai Intézet vezetőjének és munkatársainak - mindenk előtt Witold Surewicznek - az ESR spektrumok felvételéhez és kiértékeléséhez nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, - különösen Laczko Gábor tudományos segédmunkatársnak - akik támogatására és hasznos észrevételeire mindig számíthattam.

A disszertáció formai kivitelezéséért Nagynó Bodor Irént és Kristó Máriát illeti köszönet.

1. SZALAI I. (1974): Növényélettan I.
Tankönyvkiadó, Budapest, 217-220.
2. KARLSON, P. (1972): Biokémia
Medicina Könyvkiadó, Budapest, 247-249.
3. WEIER, T.E. and A.A. BENSON (1967): The molecular
organization of chloroplast membranes
Amer. J. Bot. 54, 389-402.
4. BENSON, A.A. and I. SHIBUYA (1962): Surfactant lipids.
In: Physiology and Biochemistry of Algae (Ed.: R.A.
Lewin).
Academic Press, New York and London, 371-383.
5. NICHOLS, B.W. (1965): Light induced changes in the lipids
of *Chlorella vulgaris*
Biochim. Biophys. Acta 106, 274-279.
6. JAMES, A.T. and B.W. NICHOLS (1966): Lipids of photo-
synthetic systems
Nature 210, 372-375.
7. TIEN, H.T. (1974): Bilayer lipid membranes (BLM) theory
and practice
Marcel Dekker, Inc. New York 245-321, 347-378.
8. SEELY, G.R. (1977): Chlorophyll in model systems: Clues
to the role of chlorophyll in photosynthesis
In: Primary processes of photosynthesis (Ed.: J.
Barber) Elsevier Scientific Publishing Company
Amsterdam, New York, Oxford, 1-53.
9. SHAW, A.B., M.M. ANDERSON and R.E. McCARTY (1976): Role
of galactolipids in spinach chloroplast lamellar
membranes II.
Plant Physiol. 57, 724-729.
10. MURATA, N., J.H. TROUGHTON and D.C. FORK (1975):
Relationships between the transition of the physical
phase of membrane lipids and photosynthetic param-

ters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts, *Plant Physiol.* 56, 508-517.

11. KOCHUBEI, S.M., T.M. SHADCHINA, A.A. KONONENKO, E.P. LUKASHEV, K.N. TIMOFEEV and D.N. MATGRIN (1975): Effect of galactolipase on photoreactions in light chloroplast fragments
Photosynthetica 2, 253-260.
12. MURATA, N. and D.C. FORK (1975): Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in relation to the physical phase of membrane lipids in algae and higher plants
Plant Physiol. 56, 791-796.
13. BENSON, A.A. and E.H. STRICKLAND (1960): Plant phospholipids. III. Identification of diphosphatidyl glycerol
Biochim. Biophys. Acta 41, 328-333.
14. STRICKLAND, E.H. and A.A. BENSON (1960): Neutron activation paper chromatographic analysis of phosphatides in mammalian cell fractions
Arch. Biochem. Biophys. 88, 344-348.
15. HASE, E., H. OTSUKA, S. MIHARA and H. TAMIYA (1959): Role of sulfur in cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture
Biochim. Biophys. Acta 35, 180-189.
16. BERGELSON, L.D. and L.I. BARSUKOV (1977): Topological asymmetry of phospholipids in membranes
Science 197, 224-230.
17. HATA, T., Y. SANO, A. MATSUMAE, Y. KAMIO, S. NOMURA and R. SUGAWARA (1960): Study of new antifungal antibiotic
Japan J. Bacteriol. 15, 1075-1077.
18. ARISON, B.H. and S. OMURA (1974): Revised structure of cerulenin
J. Antibiotics 27, 25-30.



19. MATSUMAE, A., S. NOMURA and T. HATA (1963): Studies on cerulenin II. Biological assay and fermentation of cerulenin
J. Antibiotics Ser. A16, 239-243.
20. MATSUMAE, A., S. NOMURA and T. HATA (1964): Studies on cerulenin IV. Biological characteristics of cerulenin
J. Antibiotics Ser. A17, 1-7.
21. FRISCH, A., A. LOYTER, R. LEVY and I. GOLDBERG (1978): Inhibition of conjugation in *Tetrahymena pyriformis* by cerulenin
Biochim. Biophys. Acta 506, 18-29.
22. NOMURA, S., T. HORIUCHI, T. HATA and S. OMURA (1972): Inhibition of sterol and fatty acid biosynthesis by cerulenin in cell free systems of yeast
J. Antibiotics 25, 365-368.
23. OHNO, T., T. KESADO, J. AWAYA and S. OMURA (1974): Target of inhibition by the anti-lipogenic antibiotic cerulenin of sterol synthesis in yeast
Biochim. Biophys. Res. Com. 57, 1119-1124.
24. NOMURA, S., T. HORIUCHI, S. OMURA and T. HATA (1972): The action mechanism of cerulenin I. Effect of cerulenin on sterol and fatty acid biosyntheses in yeast
J. Biochem. 71, 783-796.
25. D'AGNOLO, G., I.S. ROSENFELD, J. AWAYA, S. OMURA and P.R. VAGELOS (1973): Inhibition of fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin. Specific inactivation of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthetase
Biochim. Biophys. Acta 326, 155-166.
26. OHNO, H., T. OHNO, J. AWAYA and S. OMURA (1975): Inhibition of 6-methylsalicylic acid synthesis by the antibiotic cerulenin
J. Biochem. 78, 1149-1152.

27. TAKESHIMA, H., CH. KITAO and S. OMURA (1977): Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin
J. Biochem. 81, 1127-1132.
28. GREENSPAN, M.D., R.C. MACKOW and S. OMURA (1977):
The effect of cerulenin on sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*
Lipids 12, 729-731.
29. APPLEBY, R.S. (1974): Inhibition by cerulenin of lipid synthesis in *Crambe abyssinica* tissues
Phytochemistry 13, 2745-2748.
30. WARING, A.J. and G.G. LATIES (1977): Inhibition of the development of induced respiration and cyanide-insensitive respiration in potato tuber slices by cerulenin and dimethylamino-ethanol
Plant Physiol. 60, 11-16.
31. LORENZEN, H. (1964): Synchronization of *Chlorella* with light-dark changes and periodical dilution of the populations to a standard cell number
In: Synchrony in cell division and growth (Ed.: E. Zenthen), Wiley (Interscience), New York, London, Sydney, 571-578.
32. TAMIYA, H. (1964): Growth and cell division of *Chlorella*
In: Synchrony in cell division and growth (Ed.: E. Zenthen), Wiley (Interscience), New York, London, Sydney, 247-305.
33. TAMIYA, H., E. HASE, K. SHIBATA, A. MITUYA, T. IWAMURA, T. NIHEI and T. SASA (1953): Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature.
In: Algal culture from Laboratory to Pilot Plant. (Ed.: J. S. Burlew). Carnegie Institution of Washington Publication 600. Washington, D.C. 204-232.

34. HAGAR, W.G. (1972): Probit theory and applications in the analysis of synchronized growth systems
Carnegie Institution Year Book 72, Stanford, California 388-393.
35. TAMIYA, H., Y. MORIMURA, M. YOKOTA and R. KUNEIDA (1961): Mode of nuclear division in synchronous cultures of *Chlorella*: Comparison of various methods of synchronization
Plant and Cell Physiol. 2, 383-403.
36. HORVÁTH, I. (1974): Kvantitatív mikrobiológiai eljárások
Akadémiai Kiadó, Budapest, 67-70.
37. HAYAT, M.A.: Basic electron microscopy techniques
Van Nostrand Reinhold Company
New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne, 1-2.
38. AWAYA, J., T. OHNO, H. OHNO and S. OMURA (1975): Substitution of cellular fatty acids in yeast cells by the antibiotic cerulenin and exogenous fatty acids
Biochim., Biophys. Acta 409, 267-273.
39. BOGORAD, L. (1962): Chlorophylls. In: Physiology and biochemistry of algae (ed.: R.A. Lewin)
Academic Press, New York and London, 385-408.
40. FRENCH, C.S. (1960): Chlorophyll in vivo and in vitro.
In: Encyclopedia of Plant Physiology (Ed.: W. Ruhland)
Springer V. Heidelberg, 5/1, 259-271.
41. HILL, R. and C.P. WHITTINGHAM (1955): Photosynthesis
John Wiley and Sons, Inc. New York, Methuen and Co, LTD. London, 16-40.
42. ROSENBERG, A. (1967): Galactosyl diglycerides: Their possible function in *Euglena* chloroplasts Science 157, 1191-1196.
43. GOEDHEER, J.C. (1972): Fluorescence in relation to photosynthesis
Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 87-112.

44. PAPAGEORGIOU, G. (1975): Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of photosynthesis (Ed.: Govindjee). Academic Press. New York, San Francisco, London, 319-371.
45. LAVOREL, J. (1959): Induction of fluorescence in quinone poisoned *Chlorella* cells
Plant Physiol. 34, 204-209.
46. MUNDAY, J.C. Jr. and GOVINDJEE (1969): Fluorescence transients in *Chlorella*: Effects of supplementary light, anaerobiosis, and methyl viologen
In: Progress in photosynthesis research. II. (Ed.: H. Metzner), Tübingen, 913-922.
47. PAPAGEORGIOU, G. and GOVINDJEE (1968): Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo. II. *Chlorella pyrenoidosa*
Biophysical Journal 8, 1316-1328.
48. MUNDAY, J.C. Jr. and GOVINDJEE (1969): Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*
Biophysical Journal 9, 1-21.
49. FRANCK, J. and J.L. ROSENBERG (1964): A theory of light utilization in plant photosynthesis
J. Theoret. Biol. 7, 276-301.
50. MALKIN, S. (1966): Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. II. Kinetic analysis of the fluorescence intensity dependence on light
Biochim. Biophys. Acta 126, 433-442
51. JOLIOT, P. (1965): Cinétiques des réactions liées à l'émission d'oxygène photosynthétique
Biochim. Biophys. Acta, 102, 116-134.
52. DELOSME, R. (1967): Étude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense
Biochim. Biophys. Acta 143, 108-128.

53. SÁRVÁRI, É., G. HALÁSZ, P. NYITRAI and F. LÁNG (1976):
Effect of lincocin treatment on the greening process
in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves
Physiol. Plant. 36, 187-192.
54. ALBERTSSON, P.A. and H. LEYON (1954): The structure of
chloroplasts. V. *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim
studied by means of electron microscopy
Experimental Cell Research 7, 288-290.
55. ARNOLD, W. and H. SHERWOOD (1957): Are chloroplasts
semiconductors?
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 43, 105-114.
56. SHUVALOV, V.A. and F.F. LITVIN (1969): Mechanism of
prolonged afterluminescence of plant leaves and energy
storage in the photosynthetic reaction centers
Mol. Biol. 3, 59-73.
57. LURIE, S. and W. BERTSCH (1974): Thermoluminescence
studies on photosynthetic energy conversion. I.
Evidence for three of energy storage by photoreaction
II of higher plants
Biochim. Biophys. Acta 357, 420-428.
- II. Activation energies for three energy storage
states associated with photoreaction II of higher
plants
Biochim. Biophys. Acta 357, 429-438.
58. ARNOLD, W. and J. AZZI (1971): The mechanism of delayed
light production by photosynthetic organisms and a
new effect of electric fields of chloroplasts
Photochem. Photobiol. 14, 233-240.
59. RUBIN, A.B. and P.S. VENEDIKTOV (1969): On light energy
storage by photosynthesizing organisms at low
temperatures
Biofizika 14, 105-109.

60. STREHLER, B.L. and W. ARNOLD (1951): Light production by green plants
J. Gen. Physiol. 34, 809-820.
61. RUBY, R.H. (1968): Delayed fluorescence in photosynthetic materials: transient response to pulsed light in *Chlorella*
Photochem. Photobiol. 8, 299-308.
62. ARTHUR, W.E. and B.L. STREHLER (1957): Studies on the primary process in photosynthesis. I. Photosynthetic luminescence: Multiple reactants
Arch. Biochem. Biophys. 70, 507-526.
63. SWEETSER, P.B., C.W. TODD and R.T. HERSH (1961): Effect of photosynthesis inhibitors on light re-emission in photosynthesis
Biochim. Biophys. Acta 51, 509-518.
64. ERDEY-GRUZ T. és SCHAY G. (1964): Elméleti fizikai kémia
Tankönyvkiadó, Budapest, 458-462.
65. ZANKEL, K.L. (1971): Rapid delayed luminescence from chloroplasts: kinetic analysis of components; The relationship to the O_2 evolving system
Biochim. Biophys. Acta 245, 373-385
66. BARBER, J. and W.J. WARLEY (1971): Millisecond delayed light as an indicator of electrical gradients across chloroplast thylakoids
Nature New Biology 234, 188-189.
67. STACY, W.T., T. MAR, C.E. SENEGER and GOVINDJEE (1971): An analysis of a triplet exciton model for the delayed light in *Chlorella*
Photochem. Photobiol. 14, 197-219.
68. MALKIN, S. (1977): Delayed luminescence. In: Primary processes of photosynthesis (Ed.: J. Barber). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 349-431.

69. MORRISETT, J.D., H.J. POWNALL, R.T. PLUMLEE, L.C.
SMITH, Z.E. ZEHNER, M. ESFAHANI and S.J. WAKIL (1975):
Multiple thermotropic phase transitions in *Escherichia coli* membranes and membrane lipids
J. Biol. Chem. 250, 6969-6976.
70. HUBBELL, W.L. and McCONNELL, H.M. (1971): Molecular
motion in spin-labeled phospholipids and membranes
J. Amer. Chem. Soc. 93, 314-326
71. ARNOLD, W. (1966): Light reaction in green plant photo-
synthesis: A method of study
Science 154, 1046-1049.
72. ARNOLD, W. and J.R. AZZI (1968): Chlorophyll energy
levels and electron flow in photosynthesis
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 29-35.
73. GIBBS, S.P. (1962): The ultrastructure of the pyrenoids
of algae, exclusive of the green algae
J. Ultrastructure research 2, 247-261.
74. FALUDI-DÁNIEL Á. (1973): Karotinoidmutáns kloroplasztiszok
összehasonlító élettana
Doktori disszertáció tézisei, Szeged
75. DESAI, T.S., P.V. SANE and V.G. TATAKE (1975): Thermo-
luminescence studies on spinach leaves and *Engelma*
Photochem. Photobiol. 21, 345-350.
76. ICHIKAWA, T., Y. INOUE and K. SHIBATA (1975): Characteristics
of thermoluminescence bands of intact leaves and
isolated chloroplasts in relation to the water-
-splitting activity in photosynthesis
Biochim. Biophys. Acta 408, 228-239.
77. INOUE, Y., T. ICHIKAWA and K. SHIBATA (1976): Development
of thermoluminescence bands during greening of
wheat leaves under continuous and intermittent
illumination
Photochem. Photobiol. 23, 125-130.

78. IZAWA, S. (1977): Inhibitors of electron transport
In: Photosynthesis I. Photosynthetic electron transport
and photophosphorylation (Ed.: A. Trebst and M. Avron)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 270-272.
79. ARNON, D.I., D.B. KNAFF, B.D. McSWAIN, R.K. CHAIN and
H.Y. TSUJIMOTO (1971): Three light reactions and the
two photosystems of plant photosynthesis
Photochem. Photobiol. 14, 337-425
80. WOLFF, CH., K.H. BÜCHEL and G. RENGGER (1975):
Studies on the nature of the primary reactions of
photosystem II in photosynthesis
Z. Naturforsch. 30c, 161-171, 172-182.
81. RENGGER, G. (1976): The induction of a high resistance to
3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) of
oxygen evolution in spinach chloroplasts by trypsin
treatment
FEBS Letters 69, 225-230.
82. RABINOWITCH, E.I. (1956): Fluorescence and absorption
changes during the induction period
In: Photosynthesis and related processes II/2
Interscience Publishers, Inc. New York, London, 1375-1406.