B 3302

A KLOROFILL A/B FÉNYBEGYŰJTŐ ANTENNA KOMPLEX MENNYISÉGÉNEK ÉS FUNKCIÓJÁNAK NAPSZAKOS SZABÁLYOZÁSA

Egyetemi doktori értekezés

LIKER ERIKA

MTA Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet

Szeged

1995

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 1

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 3

2.1. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc, a Z-séma 3

2.2. Az első fotokémiai rendszer, a PS1 7

2.3. A második fotokémiai rendszer, a PS2 8

2.3.1. A PS2 belső antenna rendszere 9

2.3.2. A PS2 külső antenna rendszere, az LHCII 10

2.4. Szabályozó mechanizmusok 14

2.4.1. Rövidtávú adaptáció 15

2.4.2. Hosszútávú akklimatizáció 16

2.4.3. Napszakos ingadozás 17

2.5. A foszforiláció 18

2.5.1. A kloroplasztisz foszfoproteinjei 19

2.5.2. A tilakoid protein foszforiláció mechanizmusa, szerepe 21

3. CÉLKITŰZÉS 24

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 25

4.1. Növényi anyag 25

4.2. Tilakoid membrán izolálás 25

4.3. A klorofill tartalom meghatározása 26

4.4. RNS izolálása és analízise 27

4.5. Gélelektroforézis 28

4.5.1. Denaturáló gélelektroforézis 28

4.5.2. Natív gélelektroforézis 29

4.6. Cirkuláris dikroizmus 30

4.7. Fluoreszcencia indukció kinetika 30

4.8. Foszforiláció 31

4.8.1. *In vivo* foszforiláció 31

4.8.2. *In vitro* foszforiláció 32

5. EREDMÉNYEK 33
5.1 Az antennaszerkezet napszakos változásai, összefüggés az LHCII genetikailag programozott diurnális ciklusával 33
5.1.1. Az mRNS szint napszakos ingadozása 33
5.1.2. Kl-a/kl-b moláris arány 34
5.1.3. Pigment-protein komplexek 36
5.1.4. Cirkuláris dikroizmus 38
5.1.5. Az LHCII szubpopulációk analízise 40
5.2. Az LHCII diurnális ciklusának hatása a membránok funkciójára 42
5.2.1. Kl-a fluoreszcencia indukció kinetika 42
5.2.2. *In vivo* foszforiláció 44
5.2.3. *In vitro* foszforiláció 45
5.3. Gátlószerek hatása a tilakoid protein foszforilációra 47
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA 52
6.1. Az antennaszerkezet napszakos változásai, összefüggés az LHCII genetikailag programozott diurnális ciklusával 52
6.2. A diurnális ciklus hatása a membránok funkciójára 55
6.3. Gátlószerek hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára 59
7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA 62
IRODALOMJEGYZÉK 63

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATA	arany-trikarboxilát
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-izopropil-p-benzokinon
DCMU	3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetilurea
$DCPIPH_2$	redukált 2,6-diklórfenol-indofenol
DDM	n-dodecil-ß-D-maltozid
Fd	ferredoxin
FNR	ferredoxin-NADP-reduktáz
HQNO	2-(n-heptil)-4-hidrokinolin-N-oxid
kl	klorofill
LHCI	az 1. fotokémiai rendszer kl-a/b fénybegyűjtő antennája
LHCII	a 2. fotokémiai rendszer kl-a/b fénybegyűjtő antennája
MOA-stilbén	E-ß-metoxiakrilát-stilbén
NQNO	2-n-nonil-4-hidroxikinolin-N-oxid
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PC	plasztocianin
PMS	fenazin-metoszulfát
PQ	plasztokinon
PS1	az 1. fotokémiai rendszer
PS2	a 2. fotokémiai rendszer
Rubisco	ribulóz-1,5-difoszfát-karboxiláz
SDS	Nátrium-dodecilszulfát

1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis a földi élet alapvető fontosságú folyamata, amely a napfény sugárzási energiáját kémiai energiává alakítja.

A képződő szerves vegyületek a táplálékklánc és a fosszilis energiahordozók alapjául is szolgálnak. A fotoszintézisnek köszönhető a földi atmoszféra oxigénnel való ellátása is.

Ezt a komplex folyamatot zöld növényekben a következő reakcióegyenlettel írhatjuk le:

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

A fotoszintézis két részre bontható: a fény és a sötét szakaszra. A fény szakaszban az antenna pigment molekulák elnyelik a Nap sugárzási energiáját, majd a gerjesztési energiát energiaátadási folyamatok révén a reakciócentrumokba továbbítják. A reakciócentrumokban megtörténik az elsődleges töltésszétválasztás. Az ezt követő redox folyamatok, és a töltések irányított szállítása eredményeként szabadul fel a molekuláris oxigén és a redukáló erőt hordozó $NADPH_2$.

A töltésszétválasztás során a tilakoid membrán külső és belső oldala között kialakul egy elektromos potenciál különbség, és az elektrontranszportot kísérő proton felvétel következtében egy pH-grádiens, amelyek az ATP szintézis során hasznosulnak.

Az ATP molekulában kémiailag tárolt energiát és a $NADPH_2$ redukáló erejét felhasználva játszódnak le az ún. sötét reakciók ill. ezek során a szerves anyagok szintézisének lépései.

Nagy jelentőségű tehát a fotoszintézis alapfolyamatainak kutatása, minél jobb megismerése, de szem előtt kell tartanunk a gyakorlati alkalmazhatóságot is. Ez a növénynemesítés, növényvédelem és a környezetvédelem, valamint az alternatív energiaforrások területén kiemelkedő fontosságú.

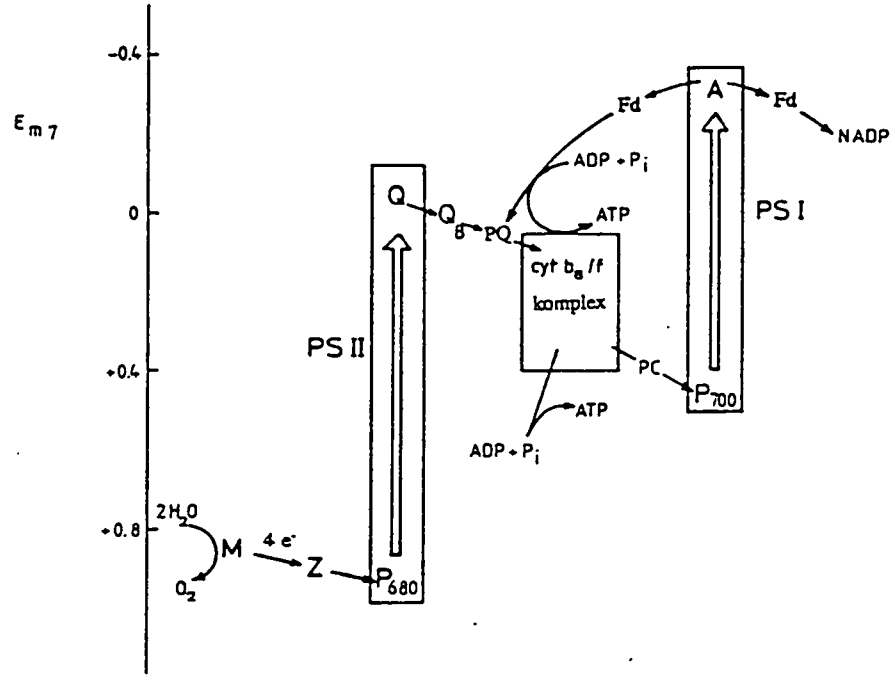
Dolgozatomban a kloroplasztisz klorofill a/b fénybegyűjtő antennakomplexének sajátságaival, illetve a diurnális oszcillációjával és foszforilációjával foglalkozom.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc, a Z-séma

Magasabb rendű növényekben, algákban és cianobaktériumokban a fotoszintézis elsődleges reakciói két reakciócentrumban zajlanak le, az 1. és 2. fotokémiai rendszerben, a két fotoszisztémában (PS1 és PS2). Mind a két reakciócentrum saját antennarendszerrel rendelkezik. A fotoszisztéma elnevezés alatt valójában a reakciócentrumokat és a hozzájuk kapcsolódó antennarendszert értjük. Magasabb rendű növényekben és zöld algákban a PS1 és a PS2 antennái eltérő arányban kl-a és kl-b molekulákat tartalmaznak. Kiszámítható, hogy kizárólag a reakciócentrum klorofill molekulái által elnyelt fényenergia még erős fényben sem biztosítaná a fotoszintetikus apparátus optimális működését. Átlagos megvilágítási viszonyok mellett ugyanis a reakciócentrumok kl-a molekulái másodpercenként csak egyszer gerjesztődnének [1]. Az optimális működéshez szükség van antenna molekulákra; ezek fotokémiailag inaktívak és szerepük a fény elnyelésére és az elnyelt energia reakciócentrumokba továbbítására korlátozódik.

Ha a fotoszintézis oxido-redukciós folyamatait sorrendben ábrázoljuk, és feltüntetjük az elektrontranszportlánc komponenseinek középponti potenciáljait, az úgynevezett Z-sémát kapjuk (1. ábra).



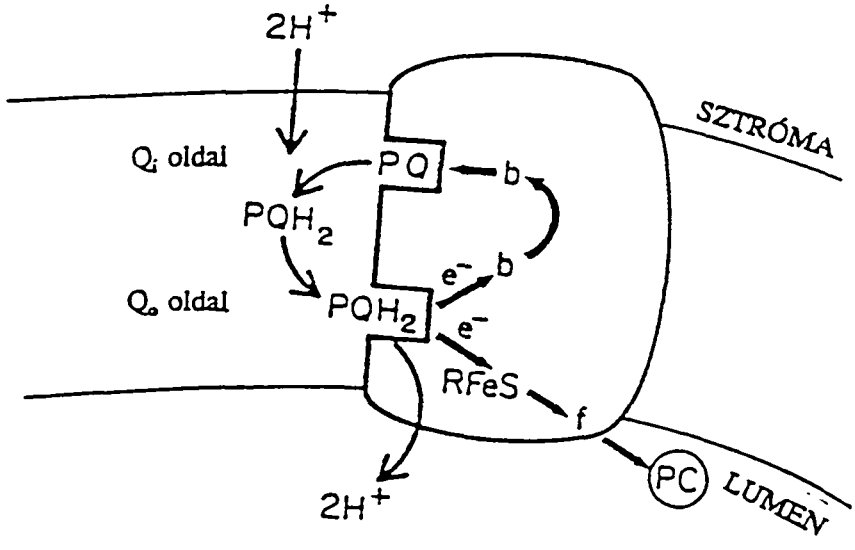
1. ábra: A fotoszintetikus elektrontranszport Z-sémája (jelmagyarázat a szövegben).

A két függőleges nyíl az elektronok útját jelzi az elsődleges donorról az elsődleges akceptorra a két reakciócentrumban. Az elsődleges donorok speciális kl-a molekulák, a PS2-ben ez a P680, a PS1-ben pedig a P700, Z a P680 elektron donora, M a vízbontó enzim. Q_A és Q_B kinonok a PS2 elsődleges és másodlagos akceptorai, PQ pedig a plasztokinon molekulák halmaza, az ún. plasztokinon-pool. A cyt b_6/f komplex a citokrómokat és a Rieske vas-kén proteint tartalmazza, PC a plasztocianint jelöli, amely egy réz tartalmú, vízoldható protein. A PS1 elsődleges akceptorát A jelöli, amely egy vas-kén protein, Fd pedig a ferredoxin, amely egy Fe-tartalmú, nem hem-jellegű fehérje.

A Z-sémából kitűnik, hogy a PS2 létrehoz egy erős oxidánst, a $P680^+$-ot, amely képes oxidálni a vizet, és egy viszonylag gyenge reduktánst, a Q_A^--t. A másik fotoszisztéma, a PS1 pedig létrehoz egy erős reduktánst, A^--t, amely köztes komponensek,

ill. a ferredoxin és a ferredoxin-NADP-reduktáz segítségével képes a NADP-t redukálni. A $P700^+$ a PS1 gyenge oxidáns terméke. A PS2 gyenge reduktánsa köztes komponenseneken keresztül reagál a PS1 gyenge oxidánsával, a $P700^+$ molekulával, és így zárul a redox folyamatok láncolata. A két reakciócentrum közötti kapcsolatban fontos szerepe van a cyt b_6/f komplexnek.

A cyt b_6/f komplex elektronokat közvetít a plasztokinol molekuláktól a plasztocianin felé, és ehhez az elektrontranszferhez kapcsolódóan protonok pumpálódnak át a tilakoid memrán sztróma felöli oldaláról a lumen felöli oldalra. Az irodalomban a cyt b_6/f komplex aktivitását leíró ún. Q-ciklust először Mitchell [2,3] közölte. E modell szerint a komplexen két kinon kötőhely található (2. ábra).



2. ábra: A cyt b_6/f komplex Q-ciklusa [4] (jelmagyarázat a szövegben).

Az egyik a Q_o hely, ahol a kinol molekulák oxidációja játszódik le, egyben ez a proton kilépés helye (proton *o*utput). A másik a Q_i hely, a kinonok redukciójának és a protonok belépésének a helye (proton *i*nput). A Q_o hely a belső, lumen felöli membrán felszínhez, míg a Q_i hely a sztróma felöli membrán felszínhez közel helyezkedik el.

A Q-ciklusra több modell ismeretes. A jelenleg leginkább elfogadott modell szerint a Q_o helyen a kinol két lépésben oxidálódik. Az egyik felszabaduló elektron a Rieske vaskén proteint, a másik pedig a komplexben található két cyt b_6 közül a Q_o hely közelében elhelyezkedő alacsonyabb potenciálú formát redukálja. Az az elektron, amelyik a Rieske proteint redukálta, további lépésekben először a cyt f-et, majd a cyt b_6/f komplex akceptorát, a lumenben található vízoldható plasztocianint redukálja. A második elektron, amely előzőleg az alacsonyabb potenciálú b-tipusú citokrómra került, a membránon áthaladva a Q_i hely közelében elhelyezkedő magasabb potenciálú cyt b_6-t redukálja. Ez az elektron a továbbiakban a kinon molekulák redukcióját végzi, első lépésben szemikinonig, majd a ciklus második körbefordulása során elérjük a teljesen redukált állapotot. A ciklus kétszeri körbefordulásának eredményeként két molekula kinol oxidálódik, egy molekula kinon redukálódik, két elektron a plasztocianint redukálja, és a kinol molekulák oxidációja során négy proton szabadul fel, amely a lumenbe kerül. Az előbbiekben leírt reakciók sorozata, az elektronok áramlása a víztől a NADP-ig, a fotoszintézis lineáris elektrontranszportja. Mind a PS1, mind a PS2 reakciócentrum körül működhet azonban ciklikus elektrontranszport is.

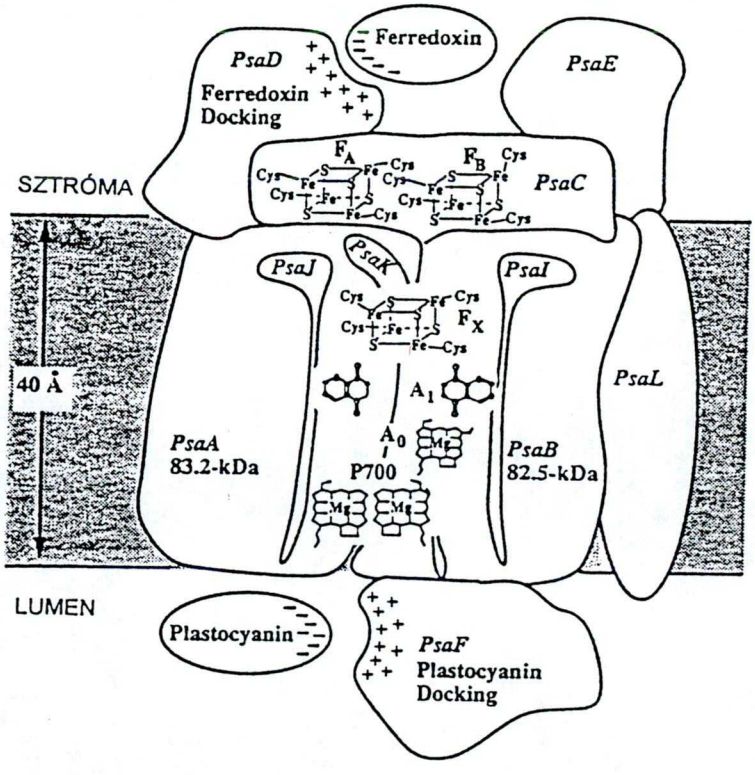
A PS1 körüli ciklus során az elsődleges reduktáns A^- felől, minden bizonnyal a Fd közbeiktatásával [5] az elektronok a PQ-nál visszakerülnek a fő elektrontranszport láncba. Izolált kloroplasztiszban a ciklikus elektrontranszport mértékét nem-fiziológiás köztitermékek segítségével (pl. PMS) nagymértékben növelhetjük.

A PS2 körül is működhet ciklikus elektrontranszport, mely során pl. a redukált feofitin molekulákról az elektronok a cyt b559-en keresztül a P680-ra kerülhetnek vissza [6].

Az elektron- és protontranszport kapcsolatát az ATP szintézissel Mitchell kemiozmotikus elmélete alapján érthetjük meg [7]. Az ATP a tilakoid membrán belső és külső oldala között fellépő potenciálkülönbség és pH grádiens felhasználásával képződik.

2.2. Az első fotokémiai rendszer, a PS1

A PS1 reakciócentrum egy plasztocianin:ferredoxin oxidoreduktáz, a tilakoid membránban kötött pigment-protein komplex. A fotoaktív komponens magában foglalja a primér elektrondonort, a P700-at, a primér elektronakceptort, az A_0-t, a köztes kinon akceptort, az A_1-et, és három vas-kén centrumot, az F_X-et, F_A-t, és F_B-t (3. ábra).



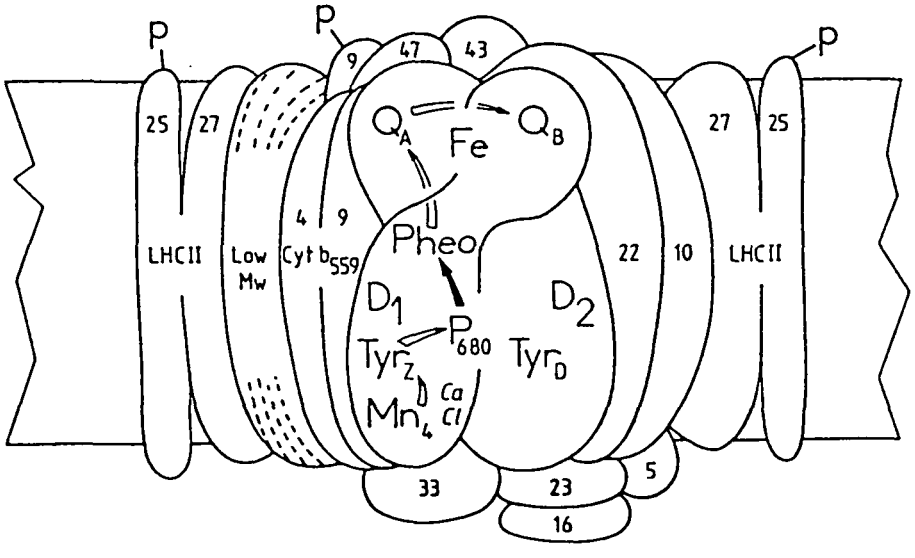
3. ábra: A PS1 szerkezete [8] (jelmagyarázat a szövegben).

A primér donor kl-a P700-at tartalmazó izolált rekciócentrum komplex két nagy molekulatömegű (82,5 és 83,2 kDa), egymáshoz nagyfokú homológiát mutató

(valószínűleg génkettőződés eredményeként előállt) komplexből áll, amelynek összesen mintegy 60 kl-a molekulája antenna funkciót lát el [9]. A reakciócentrum komplexhez közepes molekulatömegű (19-25 kDa) kl-b tartalmú (kl-a/kl-b arány 3 és 4 közötti érték) perifériás fénybegyűjtő antenna komplexek (LHCI) asszociálódnak [10][11].

2.3. A második fotokémiai rendszer, a PS2

A PS2 a lineáris elektron transzportot közvetíti a víztől a plasztokinon molekulák felé (4. ábra).



4. ábra: A PS2 partikulum szerkezete [12] (jelmagyarázat a szövegben).

A PS2-ben abszorbeálódott fényenergiát az antenna molekulák az elsődleges elektron donorra, a P680-ra továbbítják, amely valószínűleg egy kl-a dimer. A P680-ról az elektron az elsődleges elektron akceptorra, a feofitinre kerül. A töltésszétválasztás folyamata egy, a Q_A-ra történő gyors elektronátadással stabilizálódik. Egy lassabb reakció

során az elektron a másodlagos plasztokinon akceptorra, a Q_B-re jut. Egy második töltésszétválasztási reakció után a Q_B egy újabb elektront kap, és egy protonálódási reakció után plasztokinol keletkezik, amely azután disszociál a Q_B kötőhelyről. Az elektronok a plasztokinol molekulákon keresztül jutnak el a PS2-ről a cyt b_6/f komplexre.

A $P680^+$ egy Mn-tartalmú vízbontó enzim közbeiktatásával képes a vízből elektronokat nyerni, miáltal oxigén fejlődik.

A PS2 reakciócentrum-komplexe a D_1/D_2 protein heterodimer komplex, melyhez a cyt b559 is kapcsolódik [13]. A PS2 partikulum összesen mintegy 25 polipeptidet tartalmaz, köztük a belső, kl-a tartalmú antenna polipeptideket, egy 9 kDa-os polipeptidet, melynek funkcióját nem ismerjük, a vízbontó rendszer polipeptidjeit, valamint a külső antenna polipeptideket, az LHCII polipeptidjeit.

2.3.1. A PS2 belső antenna rendszere

A reakciócentrum komplexhez két kl-a komplex asszociálódik: a CP47 és a CP43. Ez a két antennakomplex, mint valamennyi kl-b molekulát nem tartalmazó komplex, a kloroplasztiszban kódolt [14]. A CP47 és a CP43 alkotja a PS2 belső, proximális antennáját. A CP47 és a CP43 polipeptidenként 20-25 kl-a és mintegy 5 ß-karotin molekulát képesek megkötni.

A PS2 proximális antennájához közel helyezkedik el néhány kisebb kl-a/b komplex, a CP29, a CP27 és a CP24 [14-16]. Ezeknek a komplexeknek a kl-a/kl-b aránya 2 és 5 közötti érték.

A CP29 kl-a/kl-b aránya 4-5, amely jóval magasabb, mint a PS2-höz tartozó fénybegyűjtő komplex, az LHCII kl-a/kl-b aránya. A CP29 sokkal szorosabban kötődik a PS2 központi magjához, mint az LHCII, és ezt a kötődést nem befolyásolják fiziológiai körülmények. Ellentétben az LHCII-vel a CP29 sosem vándorol a tilakoid membrán nem tapadt régiójába. Detergens kezelések, amelyek a PS2 preparátumokból eltávolítják a CP29-et, gátolják az elektronok eljutását a kinon akceptorokra, bár nincs bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a CP29-nek szerepe volna a kinonok elektron-akceptálásában (B.R. Green LHC review, 9ref.)

A PS2 kis mennyiségben tartalmazza a CP24 komplexet is, amely az SDS-PAGE alapján csak egy polipeptidet tartalmaz, és a kl-a/kl-b aránya kisebb, mint 1 (LHC rev. 10). Ez a komplex a PS2 magról (és a CP29-ről) az LHCII-vel együtt eltávolítható.

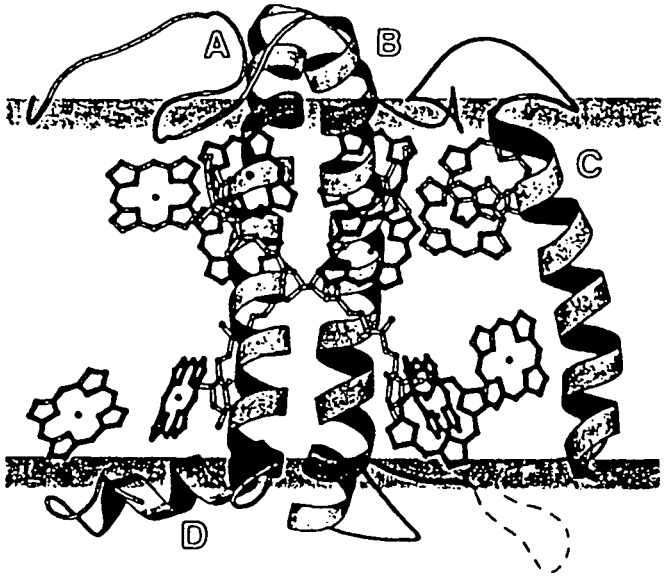
2.3.2. A PS2 külső antenna rendszere, az LHCII

A PS2-vel asszociált klorofill molekulák mintegy 70%-a az LHCII-höz tartozik. Ez a komplex a zöld algák és a magasabb rendű növények kloroplasztiszainak legnagyobb mennyiségben előforduló membránfehérjéje, így a bioszféra egyik legelterjedtebb fehérjekomplexe. Ez a komplex tartalmazza a tilakoid membránok kl-a tartalmának közel felét és a kl-b tartalom döntő hányadát (1). Az LHCII kl-b tartalma igen magas, a kl-a/kl-b aránya 1,0 és 1,2 közötti érték [17].

Az LHCII a fotoszintézis evolúciója szempontjából késői termék. A fotoszintetikus prokarióták a proklorofiták kivételével egyáltalán nem tartalmaznak kl-b-t, de még a

proklorofitákban előforduló kl-b pigment-protein komplexen belüli szerveződése is különbözik az LHCII-n belüli szerveződéstől [18].

Az a felismerés, hogy az LHCII a PS2 fénybegyűjtő antennakomplexe, Thornber nevéhez fűződik [19]. Az LHCII monomer 232 aminosavból álló polipeptidet tartalmaz, 7 kl-a, 5 kl-b molekula és 2 karotinoid (lutein) [20] valamint két különböző lipid (foszfatidil-glicerol és digalaktozil-diacilglicerol) [21] kapcsolódik hozzá.



5. ábra: Az LHCII szerkezete és elhelyezkedése a membránban [20].

A polipeptid háromszor halad át a tilakoid membránon, kettő a transzmembrán hélixek közül 30°-os szöget zár be a membrán síkjával. Nyolc klorofill kötőhelyet azonosítottak, ezek közül öt az A és B hélixhez kapcsolódik, kettő a rövidebb C hélixhez, az utolsó a D hélixhez (5. ábra). A két karotinoid molekula az A és B transzmembrán hélixekhez kötődik. Az LHCII natív funkcionális

formája trimer [22]. A monomerek összekapcsolódása több ponton történik: a C hélixen, ill. a B hélix felső végén keresztül, és az amino- és karboxil végeken, ezen kívül néhány klorofill molekula között is kialakul kölcsönhatás.

Az LHCII fajtól függően, változó arányban különböző alegységeket tartalmaz. Spenót tilakoid membránban a 27 és 25 kDa-os polipeptidek relatív aránya 4:1 [23]. Az LHCII-nek két alpopulációja izolálható. A belső, a PS2 maghoz közeli alpopulációban a 27 kDa-os polipeptid döntő túlsúlyban van, míg a másik alpopulációban, amely inkább a periférián található, a 25 kDa-os polipeptid részaránya magasabb. A belső (inner) LHCII alpopuláció szorosan kötődik a PS2-höz, míg a perifériás alpopuláció mobilis. Az LHCII foszforilációja is a perifériás alpopulációt érinti elsősorban.

Az LHCII polipeptidek a Cab géncsaládban, az Lhcb génekben vannak kódolva. Eddig hat Lhcb gént azonosítottak. Az Lhcb1 kódolja a legnagyobb mennyiségben előforduló 27 kDa-os, míg az Lhcb2 a második legnagyobb mennyiségben előforduló 25 kDa-os polipeptidet [24]. Az Lhcb3 gén terméke az Lhcb1 és Lhcb2 gének által kódolt fehérjékhez hasonló, szorosan kötődik azonban a reakciócentrumhoz. Az Lhcb4 gén terméke a CP29 apoproteint kódolja, az Lhcb5 gén terméke pedig White és Green szerint [25,26] a CP29, Bassi [27] szerint pedig a CP26 apoproteinje. Az Lhcb6 a CP24 apoprotein génje [24].

Az LHCII prekurzor formái a citoplazma riboszómáin szintetizálódnak, majd a kloroplasztiszba transzportálódnak. Ezek a prekurzorok tartalmaznak egy N-terminális tranzit peptid régiót, amely felelős a fehérjék kloroplasztiszba juttatásáért.

A tranzit peptidek eltávolítása a fehérjék tilakoid memránba való beágyazódása előtt egy, a sztrómában oldott állapotban levő proteolitikus enzim segítségével történik [28]. A

funkcionális antenna komplex kialakulásához szükség van a kl-a és kl-b ill. a karotinoid molekulák kötődésére is a tilakoid membránba integrálódott LHCII fehérjéhez [29].

Az LHCII pigmentjei, más antennakomplexek pigmentjeivel együtt, a fény elnyelését követően a gerjesztési energiát a reakciócentrumba továbbítják. Az LHCII, ezen elsődleges fotofizikai szerepén túlmenően, fontos szerepet játszik a gránumos ultrasruktúra kialakításában [30]. Cirkuláris dikroizmus (CD) vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a PS2 partikulumok (a PS2 reakciócentrum az LHCII antennával együtt) és az izolált LHCII pigment-protein komplexei egyaránt királisan szervezett makrodoménekbe rendeződnek [31]. Az LHCII, amely a PS2 partikulumokat beborítja, ill. azok perifériáján helyezkedik el, fontos szerepet játszik abban, hogy ezek a partikulumok 200-400 nm átmérőjű hálózatszerű makrostruktúrát alkothatnak. Ez a valószínűleg több ezer komplexet magába foglaló makrodomén alkothatja azt a funkcionális egységet (a pigmentek tavát), mely biztosítja a gerjesztési energia delokalizálódását [32] és a PS2 partikulumok konnektivitását [33]. A tilakoid membránban a makrodomének stabilitását és méretét a membrán LHCII tartalma, ill. a közeg ionerőssége és ozmotikus nyomása határozza meg [34]. A makrodomén szerveződés a PS2 partikulumok önaggregációs képességének tulajdonítható [35,36], ami a perifériás LHCII komplexek adhéziójával magyarázható. A PS2 részecskék ilyen módon történő aggregációja közel homogén tilakoid membrán régiót eredményez, mely régió a PS2-ben dúsult, és nagymértekben kizárja a PS1 partikulumok jelenlétét [35], valószínűleg így valósul meg a két fotokémiai rendszer térbeli elválasztása a gránum és a sztróma membránok között.

2.4. Szabályozó mechanizmusok

A fény a fotoszintézis hajtóereje, a fotoszintetizáló szervezetek növekedése szempontjából nélkülözhetetlen. Ugyanakkor az erős fényintenzitás ártalmas is lehet a fotoszintetikus apparátusra. A fotoszintézis optimális működéséhez szükség van egyrészt az alacsony fényintenzitáson a minél jobb gerjesztési energia hasznosításra, másrészt az erős fényen fellépő károsodások kivédésére. A magasabb rendű növények fotoszintetikus apparátusa képes alkalmazkodni mind a hirtelen stressz hatásokhoz, mind a fényintenzitásban bekövetkező hosszabb távú változásokhoz.

A fénystressz fő célpontja a PS2 [37]. Fénystressz hatására az elektrontranszport és a D1 protein irreverzibilisen károsodhat [38], ami ún. fénygátláshoz vezet.

A növények a fénygátlás hatásának csökkentése érdekében és egyéb környezeti stresszhatások (pl. magas hőmérséklet, sók stb.) számos stratégiát fejlesztettek ki.

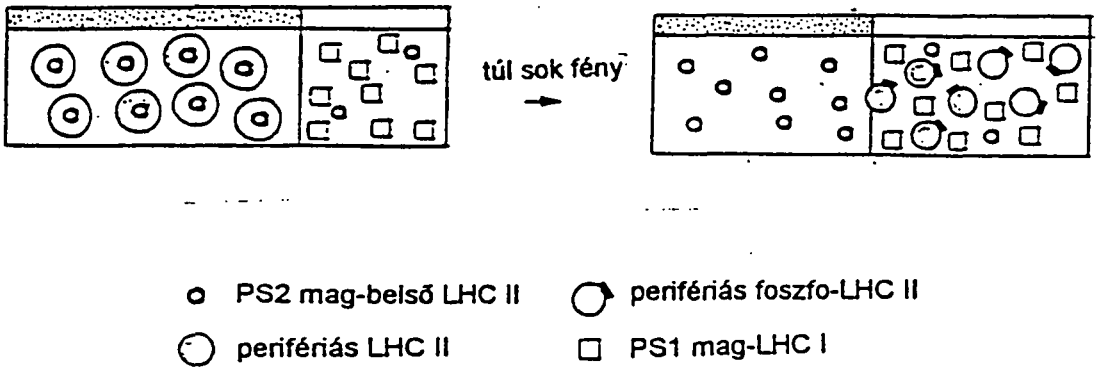
A növények fotoszintetikus membránjának dinamikus természete, azaz a szerkezet funkcióhoz hangolása fontos szerepet játszik a hirtelen stressz hatásokhoz való alkalmazkodásban. A tilakoid membrán összetételének és szerkezetének változásai szerepet játszanak abban, hogy a növények képesek alkalmazkodni a környezeti tényezőkben bekövetkező hosszabb távú változásokhoz is.

A növényekben egy többszintű regulációs mechanizmus működik, melynek részletei még kevéssé ismertek. Főbb regulációs mechanizmusok közé tartozik a rövid távú adaptáció, mely a foszforilációhoz kapcsolódó reguláció, a hosszútávú akklimatizáció, melynek működése az antenna proteinek szintézisén és degradációján alapul. Ezen túlmenően, a fotoszintézis folyamatait a genetikai program is szabályozhatja. Ezekkel a szabályozó folyamatokkal a következő fejezetekben részletesen foglalkozom.

2.4.1. Rövidtávú adaptáció

A rövidtávú adaptáció alatt a membránban 5-10 perc alatt végbemenő szabályozó folyamatokat értjük. Az egyik ilyen mechanizmus a tilakoid membrán két oldala között fellépő ΔpH-val kapcsolatos energiafüggő kioltás [39] és a zeaxantin képződés [40]. Ilyen védekező mechanizmus lehet a nagy fényintenzitás hatására létrejövő PS2 körüli ciklus is [41,42], és a két fotoszisztéma közötti energiamegoszlást szabályozó foszforiláció [43].

A membránok reverzibilis foszforilációja olyan változásokat hoz létre a membránszerkezetben, amely segíti a növényt az új környezeti viszonyokhoz való alkalmazkodásra (6. ábra). Erős fényben ha a PS2 felől az elektronáramlás gyorsabb, mint amit a PS1 fogadni tud, akkor egy redox szenzor aktiválja az LHCII foszforilációjáért felelős kinázt [44]. A foszforiláció hatására az LHCII egy része a PS2-ről disszociál, csökkentve annak antenna méretét, így az egyensúly helyreáll a két fotoszisztéma között. A PQ molekulák oxidált állapota defoszforiláción keresztül fordított irányú folyamatot idéz elő. (A foszforilációval részletesen külön fejezetben foglalkozom a későbbiekben.)



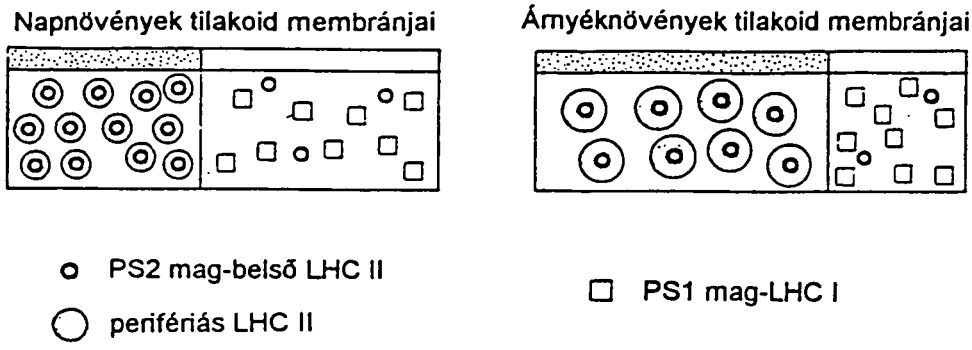
6. ábra: Foszforiláció indukált változások a tilakoid membránban [45].

A foszforiláció és a foszforilált LHCII disszociációja elsősorban a perifériás LHCII populációt érintik. A perifériás LHCII populáció a 25 kDa-os polipeptidben dúsult, ez sokkal nagyobb mértékben képes foszforilálódni, mint a 27 kDa-os polipeptid [46], amelyből a belső antenna tartalmaz többet.

Az LHCII foszforilációja fontos szerepet tölt be az ún. state tranzíció folyamatában. (A 'state transition' kifejezésnek tudomásom szerint nincs magyar megfelelője ezért ezt a jelenséget a state tranzíció szóval jelölöm a dolgozatban.) A state tranzíció alatt azt a mechanizmust értjük, amely arra szolgál, hogy optimalizálja a két fotoszisztéma működését [47,48]. A PS2-t gerjesztő fény alkalmazásakor tapasztalt maximális O_2 fejlődést elérő állapotot state 2 állapotnak, míg a PS1 fény esetén elérhető maximális O_2 fejlődéssel járó állapotot state 1 állapotnak nevezzük. Magasabb rendű növényekben és algákban a state 1-state 2 tranzíciós változásnak szerves része az LHCII polipeptidek foszforilációja, és a foszforilált LHCII disszociálódása a PS2-ről.

2.4.2. Hosszútávú akklimatizáció

A növények a nevelés során alkalmazott fényintenzitás függvényében alakítják antenna méretüket (7. ábra). Ezt hosszútávú adaptációs képességüknek köszönhetik. Általában a napnövényekben nagyobb a PS2 egységek száma, és azok antenna mérete kisebb, a PS1 antennához viszonyítva. Az árnyéknövényekben ellenben kevesebb PS2 található, az antenna mérete viszont sokkal nagyobb a PS1 egységek antennájához viszonyítva, ez biztosítja a fény minél nagyobb hatásfokkal történő továbbítását a PS2 reakciócentrumába [45].



7. ábra: Az LHCII szerkezetének változása a hosszútávú akklimatizáció során [45].

Ilyen különbség ugyanazon fajon belül, sőt a levél fény és árnyék oldala között is megfigyelhető. A növények akklimatizációja, az adaptációhoz hasonlóan, elsősorban a perifériкus LHCII populációt érinti. Alacsony fényben a perifériкus LHCII populációnak a belső populációhoz viszonyított aránya megnő.

2.4.3. Napszakos ingadozás

A hosszútávú akklimatizáció és a rövid távú adaptáció mellett a fotoszintetikus apparátus szerkezetét és működését genetikai tényezők is befolyásolhatják. Genetikai reguláció kapcsolódhat az ún. belső biológiai óra működéséhez. A Cab gének alkalmas modellrendszert biztosítanak a biológiai óra tanulmányozásához. Több kutatócsoport is beszámolt a Cab gének napi ritmust mutató kifejeződéséről [49-51].

Nagy és munkatársai [49] búzában kimutatták, hogy mind a Cab géncsalád, mind a Cab1 gén expressziója a kora délutáni órákban magas szintet mutat, majd csökkenni kezd, és minimumát éjszaka éri el. Ez a ritmikus fluktuáció az eredeti 24 órás

periodicitással fennmarad sötétben is, majd az expresszió folyamatos csökkenése után detektálhatatlanná válik. Mivel a periodikus kifejeződés a külső körülményektől függetlennek bizonyult, arra következtettek, hogy a Cab gének ilyen mintázatú expresszióját egy belső cirkadián óra szabályozza.

Az LHCII mRNS-ének diurnális oszcillációját kimutatták még petúniában [52], *Arabidopsis*ban [53] és kukoricában [54] is.

A diurnális oszcilláció fiziológiai jelentőségét még nem ismerjük. Munkánk kezdetekor az sem volt ismert, hogy a génexpresszió fluktuációja tükröződik-e fehérje szinten, és ez a fluktuáció befolyásolja-e a membránok működését. Azt sem tudtuk, hogy ez a genetikai szabályozás kapcsolatban van-e a többi szabályozó mechanizmussal, a hosszútávú akklimatizációval és a foszforilációval.

2.5. A foszforiláció

A foszforiláció jelentőségét korábban csak az állati sejtekben ismerték fel, manapság viszont egy mindenütt megtalálható szabályozó mechanizmusnak tekintik, amely hatással van a prokarióta és az eukarióta metabolizmusra, a gén expresszióra, és a környezeti tényezőkre adott válaszra. A protein foszforilációs folyamatok részt vesznek a növény növekedésének és fejlődésének szabályozásában [55]. Ebben a fejezetben a foszforiláció magasabb rendű növények kloroplasztiszaiban betöltött szerepével szeretnék részletesen foglalkozni.

2.5.1. A kloroplasztisz foszfoproteinjei

Növényekben foszfoproteineket a legnagyobb koncentrációban a kloroplasztiszban találunk [56]. Foszfoproteinek vannak a tilakoid membránban [57], és más kloroplasztisz kompartmentumokban is, a sztrómában [58], a kloroplasztisz riboszómáiban [59], a külső [60] és belső [61] határhártya (*envelope*) membránban és a határhártyák közötti részben [61]. Nem találtak eddig foszfoproteineket a tilakoid membránok belső oldalán található lumenben. A több mint 30 foszfoproteinből eddig csak 14-et azonosítottak.

A kloroplasztiszban vannak membránhoz kötött és vízoldékony foszfoproteinek. A kloroplasztisz foszfoproteinjeit elsőként Bennett mutatta ki [57] ^{32}P jelzett borsó levelekben, és *in vitro* izolált borsó kloroplasztiszokban úgy, hogy azokat $^{32}PP_i$ jelenlétében megvilágította. A két legnagyobb mértékben foszforilálódott fehérje az LHCII és a PS2 9 kDa-os fehérjéje, a psbH gén terméke volt. A tilakoid membrán legnagyobb mennyiségben előforduló foszfoproteinje az LHCII.

Az LHCII foszforilációja reverzibilis és redox függő. A foszforilációért egy kináz a felelős a defoszforilációért pedig egy foszfatáz. Az LHCII kináz a tilakoid memránban foglal helyet, azaz membránkötött enzim. A második legnagyobb mértékben foszforilálódó 9 kDa-os protein funkcióját még nem ismerjük. Erről a polipeptidről tudjuk, hogy az LHCII-vel azonos módon [62], fényfüggő reakcióban [63], egy membrán-kötött kináz katalizálásával foszforilálódik [62]. A 9 kDa-os protein foszforilációja ugyanazon redox kontroll alatt áll, mint az LHCII foszforilációja. Defoszforilációja általában lassúbb, mint az LHCII defoszforilációja [64,65], és nagyobb Mg koncentráció szükséges hozzá [66], de valószínű, hogy ezt a 9 kDa-os proteint ugyanaz a foszfatáz defoszforilálja, mint ami az LHCII-t.

A PS2-ben még további foszfoproteinek találhatók: a D1/D2 reakciócentrum proteinek, és a CP43, a PS2 belső antenna proteinje. Mind a D1/D2, mind a CP43 redox-függő foszforilációja viszonylag érzéketlen az LHCII kináz gátlószereire, és lassabban defoszforilálódik, mint a foszforilált LHCII [67].

Bhalla és Bennett kimutatta [56], hogy árpában egy membránhoz kötött kináz redox függő foszforilációt katalizál, melynek szubsztrátja egy szolubilis, 12 kDa-os sztróma protein. Ez a protein kináz valószínűleg azonos az LHCII kinázzal, mivel ez is aktiválható fénnyel, vagy redukáló anyagokkal. Ennek a 12 kDa-os proteinnek, amely gyengén kötődik egy sor tilakoid membrán proteinhez, a funkcionális szerepe ismeretlen.

Hodges és mts-i kimutatták [68], hogy a ferredoxin-NADP-reduktáz (FNR) is foszforilálódik, mégpedig az LHCII foszforilációjához hasonlóan redox kontrollált módon. Az FNR gyengén kötődik a tilakoid membrán sztróma felöli oldalához, ahol kation érzékeny komplexet képez a ferredoxinnal. Ha az FNR-t a tilakoid membránban foszforiláljuk, akkor az FNR-t a szolubilis frakcióból nyerhetjük ki nagyobb mértékben.

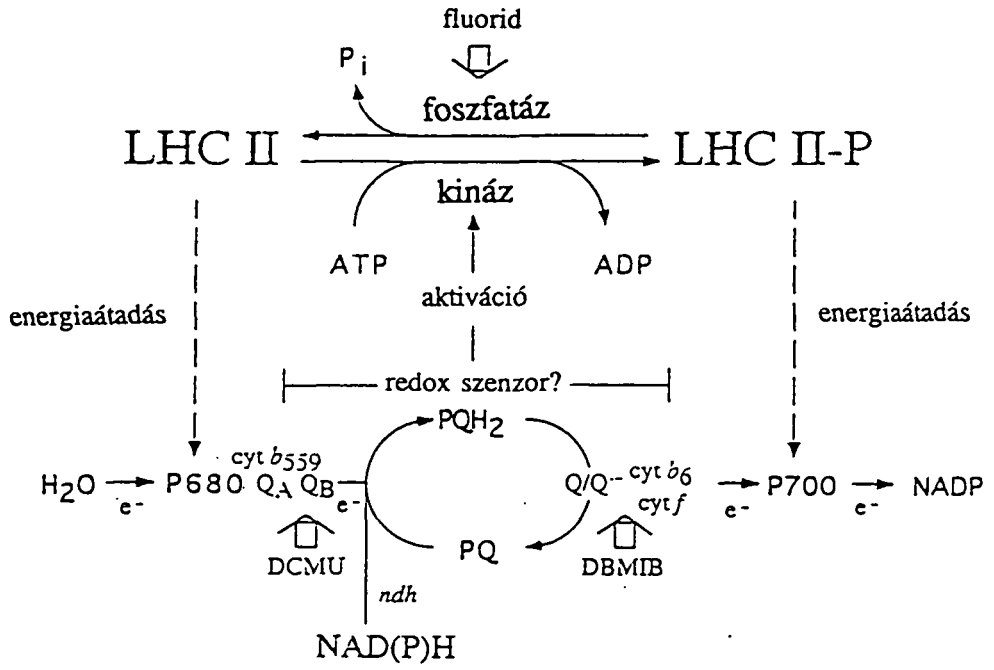
A kloroplasztisz tartalmaz vízoldékony foszfoproteineket is, ezek az asszimilációs metabolizmusban és a fehérjék importálásában vagy processzálásában vesznek részt. A sztrómában több mint tíz foszfoproteint találunk [58], köztük a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz nagy [69] és kis alegységét [70], a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt [69] és a foszfoglükomutázt [71]. Ezek foszforilációját szolubilis protein kinázok végzik. Ezek a szolubilis kinázok nincsenek szoros kapcsolatban a tilakoid kináz-foszfatáz rendszerrel [58].

2.5.2. A tilakoid protein foszforiláció mechanizmusa, szerepe

A tilakoid membránok foszfoproteinjeinek foszforilációját egy vagy több kináz végzi. Ezen enzim(ek) aktivitása szoros összefüggésben áll a fotoszintetikus elektrontranszporttal. Ezt először Bennett mutatta ki úgy, hogy az elektrontranszportot gátolta DCMU-val [63], ami a Q_A és a Q_B között gátolja az elektrontranszportot; a DCMU gátolta a kináz aktivitását is. A kináz sötétben is aktiválható, pl. redukált ferredoxin hozzáadásával. A redukált ferredoxin ugyanis elektronokat ad a PQ molekuláknak, ami aktiválja az enzimet. Az a tény, hogy szolubilis, mesterséges szubsztrátok, például hiszton [72,73], vagy az LHCII foszforilációs helyének peptid analógjai [74] szintén redox kontroll alatt foszforilálódnak, azt bizonyítja, hogy maga a kináz áll redox kontroll alatt, és nem a protein szubsztrátok konformációs állapotváltozása.

Allen és munkatársai bizonyították, hogy a kinázt aktiválni képes komponens a PS2 és a PS1 között helyezkedik el [75]. Egyrészt ugyanis a kináz sötétben is aktiválódik olyan redukáló anyagok hatására, amelyek redukálják a PQ molekulákat (pl. ditionit vagy durokinol), másrészt a fényaktivációt meg lehetett szüntetni olyan elektronakceptorok hozzáadásával, melyek meggátolják a PQ molekulák redukcióját (pl. kálium-ferricianid vagy metil-viologén). Olyan elektron donorok, mint például a $DCPIPH_2$, amelyek közvetlenül a PS1-be juttatják az elektronokat, nem aktiválják a kinázt [75].

Az LHCII foszforilációja kapcsolatot teremt a PS1 és a PS2 közötti energiamegoszlás és a két fotoszisztéma közötti elektronhordozók redox állapota közötti a kapcsolat lehetővé tesz egy visszacsatolási mechanizmust, amely szabályozza a fényenergia fotoszintetikus konverzióját. A 8. ábra összefoglalja a foszforilációval kapcsolatos eddigi ismereteinket.



8. ábra: Az LHCII reverzibilis foszforilációjának mechanizmusa [44].

Amikor a PQ molekulák redukált állapotban vannak, egy redox szenzor, ami ugyan közel van a PQ molekulák halmazához, de azzal nem azonos, aktiválja az LHCII foszforilációjáért felelős kinázt, miáltal az LHCII foszforilálódik. A foszforilált LHCII a gerjesztési energiát a PS1 felé továbbítja, ami a PQ molekulák oxidációjához vezet. Az LHCII foszfatáz aktivitása nem függ a redox állapottól [76]. Amikor a PQ molekulák oxidált állapotban vannak, a kináz inaktív, érvényesülni tud a foszfatáz aktivitás, defoszforilálódik az LHCII, a gerjesztési energia visszajut a PS2-höz, és így növeli a PQ molekulák redukciójának arányát.

Kísérletek sora bizonyítja, hogy a kinázt nem közvetlenül a plasztokinol, hanem a cyt b_6/f komplex aktiválja. Ezek az eredmények szolgáltattak először bizonyítékot arra, hogy a cyt b_6/f komplex szerepet játszhat a foszforilációban, és így a két fotoszisztéma közötti energiamegoszlásban, túlmenően elsődleges szerepén, nevezetesen, hogy katalizálja a plasztokinoltól a plasztocianin felé történő elektrontranszportot.

Az egyik fontos bizonyítékot a cyt b_6/f komplex kináz aktiváló szerepére Gal és munkatársai békalencse cyt b_6/f hiányos mutánson végzett kísérlete szolgáltatta [77]. Ez a mutáns normális membrán ultrastruktúrával, normális PS1 és PS2 reakciócentrummal, plasztokinon molekulákkal, LHCII-vel rendelkezik, de nem foszforilálja az LHCII polipeptideket sem fényen, sem pedig sötétben durokinol reduktáns jelenlétében. Gal és munkatársai nemcsak az LHCII foszforilációjának teljes hiányát tapasztalták, hanem azt is, hogy a mutánsban nincs state tranzíció sem. A többi PS2 polipeptid foszforilációja nem változott [78]. Eredményeikből az is kitűnik, hogy a mutánsban a 9 kDa-os protein foszforilációja is gátolt, a mutáció viszont a hiszton, mint exogén szubsztrát foszforilációját nem érintette. A mutáció szelektív hatása az LHCII foszforilációra azt sugallja, hogy a többi PS2 polipeptid foszforilációjáért egy másik kináz a felelős.

Lemaire és munkatársai cyt b_6/f hiányos *Chlamydomonas* mutánsokat vizsgáltak, [79] és azt tapasztalták, hogy bár mind az LHCII, mind a PS2 polipeptidek foszforilálódtak, de a foszforiláció nem volt többé redox kontroll alatt. Ezért arra következtettek, hogy az LHCII kináznak a redox aktivácóhoz szüksége van egy intakt cyt b_6/f komplexre.

Bennett és munkatársai kukorica cyt b_6/f hiányos mutánsokon szintén az LHCII foszforilációjának elmaradását figyelték meg. Ugyanakkor viszont a PS2 mind a négy foszfoproteinje (D1, D2, CP43 és a 9 kDa-os protein) foszforilálódott [80].

Bár minden adat azt erősíti, hogy a cyt b_6/f komplexnek az aktiváció folyamatában kulcsfontosságú szerepe van, a cyt b_6/f pontos szerepe a foszforilációban közel sem tekinthető tisztázottnak. Fontos kérdés annak eldöntése, hogy mi az a redox szenzor, ami a kináz aktivációhoz szükséges redox állapot változást érzékeli, ill. a kináz aktiváció a cyt b_6/f komplex mely helyén jön létre.

3. CÉLKITŰZÉS

A növényekben egy többszintű regulációs mechanizmus biztosítja a fotoszintetikus apparátus optimális működését. Ezek egy jelentős része az antenna összetételét, szerkezetét és funkcióját szabályozza. A reguláció a környezeti feltételekre adott válasz szerint lehet rövidtávú adaptáció, amely a tilakoid membránok egyes pigment-protein komplexeinek foszforilációjával jár, lehet hosszútávú akklimatizáció, amelynek során a komplexek szintézise játszik kulcsszerepet, de lehetséges a genetikai szabályozás is pl. egyes gének expressziójának napszakos ritmus szerinti szabályozása révén. Ennek a többszintű regulációnak több elemét már jellemezték ugyan, de a molekuláris mechanizmusok nagyobbik része ma sem ismert kellő részletességgel. Az egyes regulációs mechanizmusok között feltételezhető összefüggésekről pedig jószerivel semmit sem tudunk.

Munkám során elsősorban a kloroplasztisz legnagyobb mennyiségben előforduló, és a regulációk által is leginkább érintett antenna komplexével, az LHCII-vel foglalkoztam. Vizsgálatainkkal szerettünk volna hozzájárulni az LHCII-t érintő különböző szabályozó folyamatok molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez valamint szerettünk volna adatokat nyerni azok esetleges összefüggéseire.

Az 1980-as évek végén vált ismertté, hogy az LHCII mRNS szintje napszakos ingadozást mutat. Semmi adat nem állt azonban rendelkezésre arra, hogy az mRNS szinten meglévő diurnális oszcilláció tükröződik-e fehérje szinten, azaz detektálható-e az LHCII mennyiségének napszakos ingadozása tilakoid membránokban. Még kevésbé volt világos az, hogy a diurnális "program" befolyásolja-e a membrán szerkezetét és funkcionális sajátságait. Nem volt adat azt illetően, hogy ez a genetikai szintű szabályozás mutat-e rokonságot a hosszútávú akklimatizációhoz és befolyásolja-e a rövidtávú adaptációs folyamatokat, azaz a foszforilációt, melynek mechanizmusát gátlószerekkel is vizsgáltuk.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növényi anyag

A búza csíranövényeket (*Triticum aestivum*, cv Ságvári) fitotronban neveltük 16 óra világos (6-22 óráig), és 8 óra sötét (22-6 óráig) napszakos ritmusban. Az 1000 $\mu mol/m^2s^{-1}$ fényerősségű fehér fényt fluoreszcens lámpákkal állítottuk elő. Az elsődleges levelek három szegmentumát - a bazális, a középső és felső darabját különítettük el, és ebből izoláltunk tilakoid membránokat. A bazális és a felső darabok 1,5-1,5 cm nagyságúak, a középső szakasz 2-4 cm volt. A szegmentumokat minden kísérletben külön-külön vizsgáltuk.

A borsót (*Pisum sativum*) klímakamrában neveltük állandó fényen, a foszforilációs kísérletekhez 14 napos leveleket használtunk.

4.2. Tilakoid membrán izolálás

A kísérleteinkhez szükséges tilakoid membránokat a következőképpen izoláltuk: a szegmentumokra bontott leveleket izoláló pufferben (30 mM Tricin, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 10mM NaCl, 400 mM szaharóz) dörzsmozsárban homogenizáltuk, majd kétrétegű 20 μm-es lyukátmérőjű nylon szűrőn leszűrtük. A kloroplasztiszokat centrifugálással (3000 g, 5 perc) különítettük el, majd hipotóniás pufferben (30 mM Tricin, pH 8,0, 10 mM

$MgCl_2$, 10 mM NaCl) felszuszpendáltuk. A tilakoid membránokat centrifugálással gyűjtöttük össze (3000 g, 5 perc), végül az első izoláló mediumban szuszpendáltuk fel.

Az *in vivo* foszforilációs kísérletek során a tilakoid membránok izolálásakor használt összes puffer 10 mM NaF-ot tartalmazott.

A különböző gátlószerek vizsgálatához 14 napos borsó levelekből izoláltunk tilakoid membránokat. Az izolálás menete hasonló volt az előzőekben leírtakhoz, kivéve, hogy a homogenizálást itt késes homogenizátorban végeztük. Az izoláló puffer összetétele 50 mM Hepes pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Na-aszkorbát, 0.33 M szorbitol, a mosó puffer összetétele pedig 10 mM Hepes pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$ volt.

A natív gélelektroforézishez használt tilakoid membránokat úgy állítottuk elő, hogy a homogenizálás 50 mM Tricin pH 8,0, 400 mM szaharóz, 10mM NaCl, 5mM $MgCl_2$ izoláló pufferben történt, a szűrés utáni centrifugálás 3000 g-vel 10 percig tartott. A membránokat mosó pufferben (25mM Tricin, pH 8,0, 1mM EDTA) szuszpendáltuk fel, majd lecentrifugáltuk (5000 g, 10 perc), ezt újabb mosás és centrifugálás követte (10000 g, 10 perc). Az üledéket 50 mM Tricin (pH 8,0) pufferben szuszpendáltuk fel, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a felhasználásig -70°C-on tároltuk.

4.3. A korofill tartalom meghatározása

A klorofill tartalom meghatározása Arnon módszerével történt [81]. A kloroplasztisz szuszpenziót 80 %-os acetonba téve a mérést zavaró fehérjék kicsaphatók, és centrifugálással eltávolíthatók. A kl-a és kl b abszorpcióját 664 és 646 nm-en mértük

(A_{664}, A_{646}). A spektrofotométert 720 nm-re nulláztuk. A kl-a és kl-b tartalom az alábbi módon számítható:

$$\text{kl-a} = 12{,}7\ A_{664} - 2{,}69\ A_{646}$$

$$\text{kl-b} = 22{,}9\ A_{646} - 4{,}68\ A_{664}$$

A klorofill tartalmat nemcsak kloroplasztisz szuszpenzióból, hanem levélből is meghatároztuk. Ilyenkor a levél darabkákat 80 %-os acetonban dörzsmozsárban homogenizáltuk, és centrifugálás után a felülúszó abszorpcióját mérve a klorofill tartalmat a fent leírt módon határoztuk meg.

4.4. RNS izolálása és analízise

A búza csíranövény szegmentumai mRNS szintjének meghatározásához a teljes növényi RNS-t a búza levél szegmentumaiból arany-trikarboxilát (ATA), mint RN-áz inhibítor jelenlétében, Nagy és mtsi [82] szerint izoláltuk. A leveleket folyékony N_2-ben lefagyasztottuk, majd dörzsmozsárban homogenizáltuk. A homogenizátumot 5 ml extrakciós pufferrel (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0, 2 % SDS, 10 mM β-merkaptoetanol, 1 mM ATA) összeráztuk, majd 42 °C-on inkubáltuk, míg az oldat ki nem tisztult. Az oldatot KCl-dal kisóztuk, majd centrifugálás után a felülúszóból az RNS-eket LiCl segítségével kicsaptuk. A centrifugálással összegyűjtött csapadékot steril vízben feloldottuk, fenolozással tisztítottuk, majd hideg etanollal ismét kicsaptuk. A csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, majd szárítás után steril vízben oldottuk. Az RNS koncentrációt OD_{260} mérés segítségével állapítottuk meg.

A Cab1 mRNS szint meghatarozasát S1 nukleáz védelem módszerével szintén Nagy és mtsi [82] szerint végeztük. A módszer lényege az, hogy az RNS-t radioaktív egyes szálú Cab1 DNS próbával hibridizálva RNS-DNS kettős szálú hibrid alakul ki. Az S1 nukleáz csak az egyes szálú nukleinsavakat tudja emészteni, így az RNS-DNS kettős szál megmarad. Emésztés után a reakcióelegyből az RNS-DNS hibrid etanollal kicsapható. A csapadékot formamidot tartalmazó pufferben oldottuk, 4 perces forralással denaturáltuk, majd ureát tartalmazó poliakrilamid gélen megfuttattuk. Autoradiográfiával az mRNS szint megállapítható.

4.5. Gélelektroforézis

A fehérjék és intakt komplexek elválasztására és analizálására elterjedten használatos módszer a gél elektroforézis. A módszer lényege, hogy detergens segítségével szolubilizált fehérjék vagy komplexek elektromos térben a pozitív pólus felé vándorolnak.

4.5.1. Denaturáló gélelektoforézis

A denaturáló gélelektroforézis során az izolált tilakoid membránokból a fehérjéket 80 %-os acetonban kicsaptuk, majd 2 %-os SDS-t tartalmazó pufferben szolubilizáltuk (17,5 mM TRIS, pH 8,8, 12,5 % glicerin, 0,1 mM EDTA, 0,005 % brómfenolkék, 2 % SDS, 2,5 % β-merkaptoetanol). A β-merkaptoetanol a diszulfid hidakat redukálja, a teljes denaturálást pedig a minták 5 percig tartó 90 °C-on történő inkubálásával értük el. Az

esetleges nem szolubilizálódott részecskék eltávolítására 5 perces centrifugálást alkalmaztunk. Az elektroforézist Laemmli [83] módszerével végeztük, a szeparáló gél 10-18 %-os grádiens gél volt.

A gélek analízisét video denzitométerrel végeztük, (MCID, Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada), a 25 és 27 kDa-os polipeptidek arányát a görbe alatti területek aránya adja.

4.5.2. Natív gélelektroforézis

A natív gélélektroforézis abban különbözik a denaturáló gélelektroforézistől, hogy a fehérjéket nem denaturáljuk, így a pigment-protein komplexek nem válnak szét egymástól. Ezt enyhébb detergenskezeléssel és alacsony hőmérséklettel érhetjük el.

Az elektroforézist Anderson módszerével végeztük [84]. A tilakoidokat SDS helyett DDM-mel szolubilizáltuk. A búza három szegmentumából izolált tilakoidok a szolubilizálás során különbözőképpen viselkedtek. A felső két szegmentum esetében a DDM/kl súlyarány 7,5:1, míg a bazális szegmentum esetében több detergens szükséges a megfelelő szolubilizáláshoz, itt az arány 10:1 volt.

A natív gélelektroforézis esetében mini géleket használtunk, a szeparáló gél 8 %-os, a stacking 4 %-os volt. A futtatáshoz LKB Midget elektroforézis készüléket alkalmaztunk, a gélt 20 percig 15 mA áramerősséggel előfuttattuk, majd a mintákat rögtön a szolubilizálás után vittük fel. A futtatás alatt a hőmérséklet 4 °C, az áramerősség 15 mA, a futási idő 30-45 perc volt. A géleket Beckman DU-8B spektrofotométerrel pásztáztuk 650 és 670 nm-en. A géleken az LHCII tartalmat a CP1 és CP1a komplexek

összegére, mint belső standardra vonatkoztattuk, így vizsgáltuk az LHCII relatív feldúsulását a nap folyamán.

4.6.Cirkuláris dikroizmus

A CD, a balra és jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciójának különbsége. A búza csíranövény különböző szegmentumaiból izolált tilakoid memránok CD spektrumát JASCO 40C spektropolariméterrel vettük fel. Az optikai sávszélesség 4nm, a minták kl(a+b) koncentrációja 20 μg/ml volt.

4.7. Fluoreszcencia indukció kinetika

Kl-a fluoreszcencia indukciós kinetikai méréseket búza leveleken egy hengeres foszforoszkóp tipusú mérőberendezésen mértük. Mérés előtt a leveleket sötétben 4 °C-on tartottuk kb. két órán keresztül, majd a két plexiüveg közé helyezett levéldarabot tartalmazó küvettát a szobahőmérsékletű mérőhelyre tettük és 10 percig sötétben adaptáltuk. A fluoreszcencia hatásfokát gyenge 485 nm-es mérőfénnyel mértük, melyet egy 35 W-os lámpából SPM 2 (Zeiss) monokromátoron keresztül nyertünk. A mérőfénnyel ellenkező fázisban kapuzott, azzal 90 fokot bezáró, gerjesztő fény egy 650 W-os lámpából érkezett hőszűrés (víz), valamint vörös (Schott RG 1) és távoli vörös (RG 1 és RG 9) üvegszűrők közbeiktatása után. A fluoreszcencia intenzitásának időbeli változását egy Corning CS 2-58 szűrővel védett fotoelektronsokszorozóval detektáltuk. A 10 percig

szobahőmérsékleten a mintatartóban sötétben tartott leveleket szintén 10 percig vörös fénnyel világítottuk meg, hogy elérjük a fluoreszcencia stacionárius szintjét (state 2). Ezután távoli vörös fényt alkalmazva elértük a kl fluoreszcencia egy másik stacionárius állapotát (state 1). 10 perc eltelte után a távoli vörös fényt kikapcsoltuk, és vörös fényt alkalmaztunk. A fluoreszcencia hozamban történő változást vonalírón rögzítettük.

4.8. Foszforiláció

A foszforiláció során a proteinekhez foszfát csoport kapcsolódik. Kísérleteinkben a foszforiláció mértékét ^{32}P radioaktív izotóp segítségével autoradiográfiás módszerrel állapítottuk meg.

4.8.1. *In vivo* foszforiláció

Levelekben az LHCII foszforilációs szintjének mérését *in vivo* foszforilációs kísérletekkel végeztük. A vízkultúrán nőtt 5 napos búza csíranövényeket ^{32}P ortofoszfáttal jelzett tápoldatba helyeztük. 48 órán keresztül ebben a tápoldatban neveltük. Az ily módon radioaktív izotóppal jelölt csíranövényből tilakoid membránokat izoláltunk úgy, hogy a leveleket mintavétel után rögtön jégre tettük, és az izoláláskor alkalmazott összes pufferhez 10 mM NaF-ot adtunk. Az izolált tilakoid membránokat denaturáló gélen megfuttattuk, majd a jelölődés mértékét autoradiográfiával állapítottuk meg.

4.8.2. *In vitro* foszforiláció

A 4.2. pontban leírt módon izolált tilakoid membránokat 30 percig sötétben inkubáltuk, hogy a minták teljesen defoszforilálódjanak. A defoszforilálódott mintákat még sötétben összemértük a reakcióeleggyel, mely a következő végkoncentrációkat tartalmazta: 30 mM tricin (pH 8,0), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl, 10 mM NaF és 0,1 M szaharóz. A reakcióban a kl koncentráció 0,4 mg/ml volt. A foszforilációt ^{32}P jelzett ATP hozzáadásával indítottuk, melynek koncentrációja 0.2 mM, fajlagos aktivitása pedig 100 μCi/μM ATP volt. A foszforilációt fénnyel aktiváltuk, 3 db 60 W-os izzó segítségével, a minták közvetlenül a foszforiláció kezdete előtt kerültek fényre. Amennyiben a foszforilációt gátlószerek jelenlétében vizsgáltuk, azokat előzetesen 95 %-os etanolban oldottuk, majd a reakcióelegyhez adtuk úgy, hogy az etanol végkoncentrációja ne haladja meg az 5 %-ot. A foszforilációt 5 perc eltelte után jéghideg 80 %-os aceton hozzáadásával állítottuk le. A fehérjéket deneturáló gélen megfuttattuk, majd a foszforiláció mértékét autoradiográfiával állapítottuk meg.

A gátlószeres kísérletek esetében a foszforiláció mértékét foszfoimagerrel állapítottuk meg. (A foszfoimager kifejezésnek nem ismerek magyar megfelelőjét, a továbbiakban ezzel a szóval jelölöm a foszforiláció mértékének megállapítására használatos eszközt.)

Az izotópfelvétel kinetikájának vizsgálatakor mintavétel után a levelek aktivitását vízben, Cserenkov sugárzás mérésével állapítottuk meg. A kinetikai görbén egységnyi súlyra vonatkozó beütésszámot tüntettünk fel.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az antennaszerkezet napszakos változásai, összefüggés az LHCII genetikailag programozott diurnális ciklusával

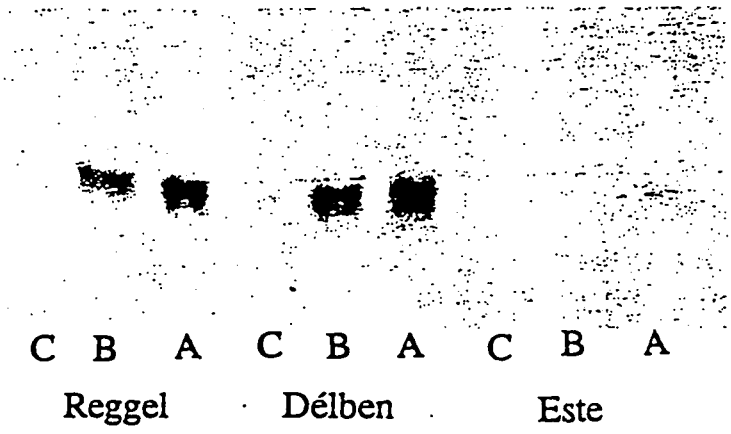
Korábban ismert volt, hogy búzában az LHCII mRNS szintje diurnális oszcillációt mutat [49]. Azt viszont nem tudtuk, hogy ez az oszcilláció kimutatható-e fehérje szinten, azaz befolyásolja-e a membránokban az LHCII mennyiségét, és összetételét. Az LHCII-höz kötődő diurnális oszcilláció fiziológiai szerepét illetően vizsgálataink megkezdése előtt semmilyen adat nem állt rendelkezésre.

Fiatal búza levelekben a bazális merisztémának köszönhetően a sejtek és a kloroplasztiszok fejlődési grádienst mutatnak a levélcsúcs irányában, ezért az elsődleges levelek három szegmentumán - a bazális, a középső és a felső darabján -vizsgáltuk az mRNS diurnális oszcillációját, és ugyanezen szegmentumokon végeztük az antenna összetételére és szerkezetére, valamint a tilakoid membránok működésére vonatkozó vizsgálatainkat is.

5.1.1. Az mRNS szint napszakos ingadozása

A 9. ábrán a Cab1 mRNS szint nagymértékű diurnális oszcillációját figyelhetjük meg a búza csíranövény első levelének bazális és a középső szegmentuma esetében. A

reggeli és a déli magas érték után az mRNS mennyisége estére visszaesett. A felső szegmentumban nem találtunk detektálható mRNS mennyiséget.



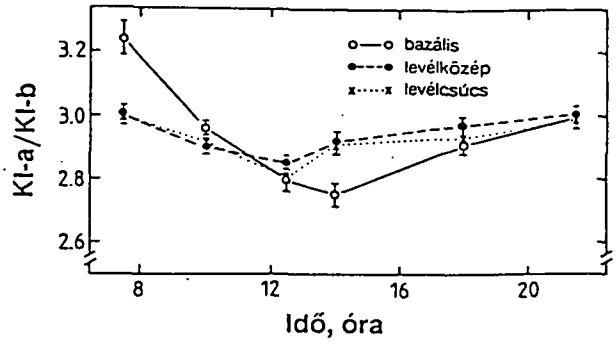
9. ábra: A Cab1 mRNS szintje reggel (7 órakor), délben (12 órakor) és este (22 órakor) 7 napos búza levelek bazális (A), középső (B) és felső (C) szegmentumaiban.

Láthatjuk tehát, hogy búza csíranövényben az mRNS diurnális oszcillációja főleg a fiatal szövetekre jellemző.

5.1.2. Kl-a/kl-b moláris arány

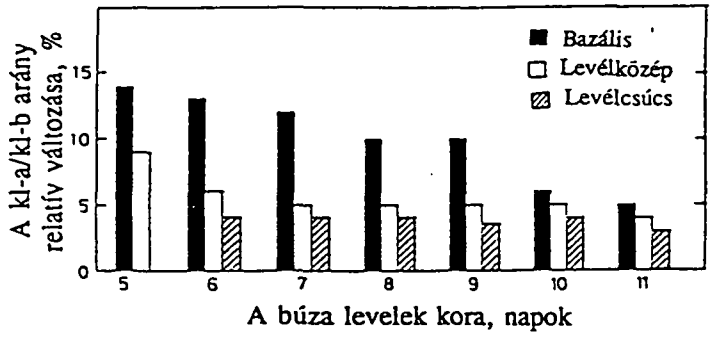
Annak eldöntésére, hogy az oszcilláció tükröződik-e az LHCII mennyiségében, első közelítésben a búza csíranövény kl tartalmát és a kl-a/kl-b arányát vizsgáltuk a nap folyamán. Az LHCII kivételével valamennyi pigment-protein komplex kl-a/kl-b aránya 3 körüli érték, vagy annál lényegesen magasabb [14]. Minthogy a levelekben reggel mérhető kl-a/kl-b arány általában 3 körüli értéket vesz fel, az LHCII (kl-a/kl-b $\approx$ 1) mennyisége szignifikáns, és mennyiségének tükröződnie kell a kl-a/kl-b arány csökkenésében. Vice versa, a kl-a/kl-b arány szignifikáns csökkenése csak az LHCII relatív feldúsulásával magyarázható.

A kl-a/kl-b arány a bazális szegmentumban jól kimutatható oszcillációt mutat (10. ábra). Ez tehát azt jelzi, hogy az LHCII mennyiségét jelentősen befolyásolja az mRNS szint diurnális oszcillációja. A középső és felső szegmentumokban kisebb oszcillációt tapasztalunk. A friss súlyra számított kl tartalom a reggeli értékhez képest délre megnő, ami *de novo* kl szintézisre utal (nincs ábrázolva).



10. ábra: A kl-a/kl-b arány napszakos ingadozása 6 napos búza levelek különböző szegmentumaiban.

Ha a relatív változásokat a levél korának függvényében ábrázoljuk (11. ábra), azt látjuk, hogy az LHCII tartalom oszcillációja fokozatosan csökken a levél korának növekedésével. Ez valószínűleg a levelek fejlődése során fellépő mRNS-szint csökkenés következménye. Feltehetőleg ugyanazzal magyarázható az is, hogy a kl-a/kl-b arány változása a levél felső szegmentumában a három szegmentum közül a legkisebb mértékű.

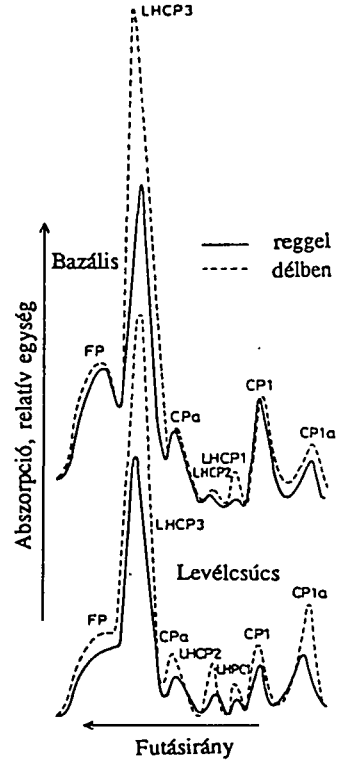


11. ábra: Búza levelek kl-a/kl-b moláris arányának relatív változásai a bazális, középső és felső szegmentumokban a levelek öregedése során. A relatív változásokat a 7 órakor és a 14 órakor megállapított kl-a/kl-b értékek alapján határoztuk meg. Az ábrázolt adatok 5 független kísérlet eredményeinek átlagai.

5.1.3. Pigment-protein komplexek

Annak alátámasztására, hogy a kl-a/kl-b arányban bekövetkező változások valóban az LHCII tartalom változásait tükrözik, natív gélelektroforézis vizsgáltuk végeztünk.

Az elektroforézis során - egyezően az irodalmi eredményekkel [84] - hét zöld sávot kapunk (12. és 13. ábra). A CP1 és CP1a a PS1 kl-a-protein komplexei, ahol CP1a a CP1 oligomer formája. Az LHCP három sávban jelenik meg: LHCP3 a monomer forma, az LHCP1 és az LHCP2 az oligomer formák. A PS2 reakciócentrumot a CPa tartalmazza. A legalsó sáv a szabad pigment (FP).



12. ábra: A tilakoid membrán natív gélelektroforézissel elválasztott pigment-protein komplexei.

13. ábra: 8 napos búza levelek bázális és felső szegmentumaiból reggel (6 órakor) és délben (14 órakor) izolált tilakoid membránok natív gélelektroforézissel elválasztott pigment-protein komplexeinek pásztázási képe 650 nm-en.

A géleket 650 és 670 nm-en pásztázva a bazális szegmentumban határozott napszakos ingadozást lehetett kimutatni az LHCII tartalomban: a reggeli értékhez képest az LHCII mennyisége a déli órákra jelentősen megnövekedett (13. ábra).

Az I. táblázat áttekintést ad az egyes szegmentumok esetében az LHCII mennyiségének növekedéséről. Az LHCII mennyiségét (az LHCP1 és LHCP3 sávok pásztázásakor kapott görbék alatti területek összege), a PS1 sávokra (CP1+CP1a), mint belső standardra vonatkoztattuk, és a kapott reggeli értékeket 100 %-nak vettük.

I. táblázat

Az LHCII komplexek (LHCP1+LHCP3) mennyiségének változása a PS1 komplexek (CP1+CP1a) mennyiségéhez viszonyítva a nap folyamán

	(LHCP1+LHCP3)/(CP1+CP1a), % zárójelben: kl-a/kl-b		
	Reggel	Délben	Este
Bazális	100 (2.99)	125.1 (2.67)	110.3 (2.74)
Levélközép	100 (2.78)	102.0 (2.66)	105.2 (2.78)
Levélcsúcs	100 (2.73)	112.1 (2.62)	105.3 (2.69)

A tilakoid membránokat reggel (6 órakor), délben (14 órakor) és este (22 órakor) izoláltuk. Az adatok három független kísérletből származó eredmények átlagértékei.

Látható, hogy minden szegmentum esetében az LHCII mennyisége - az LHCP1 és LHCP3 összege - a PS1 komplexekre vonatkoztatva reggeltől délig megnő. Legnagyobb

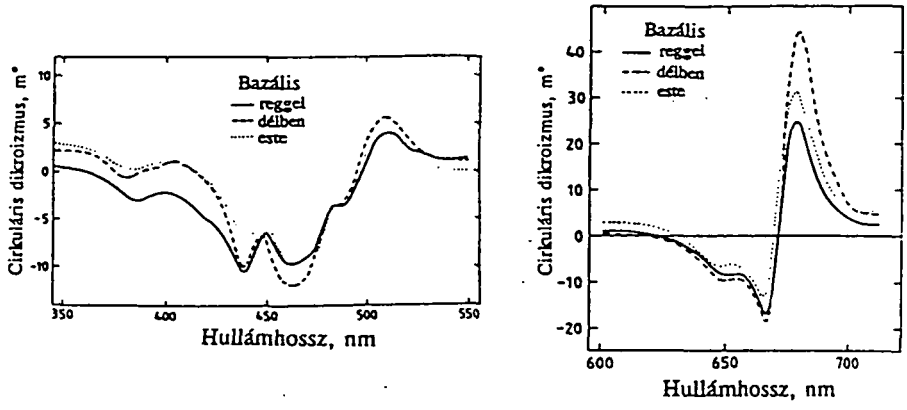
változást, 25.1%-ot a bazális szegmentum esetében tapasztaltunk. Sokkal kisebb mértékű napszakos ingadozást tudtunk megfigyelni a középső és a felső szegmentumokban.

A párhuzamos kísérletekben a kl-a/kl-b arány és az LHCII komplexek elektroforézis segítségével meghatározott mennyisége viszonylag szűk intervallumokban változott. A bazális szegmentum esetében például három független kísérlet során a kl-a/kl-b moláris arány reggel 2,98 és 3,03 közé esett, délre ez az arány 2,63 és 2,67 közötti értékekre csökkent. Ugyanezen levéldarabokból készített szolubilizált membrán preparátumok (LHCP1+LHCP3)/(CP1+CP1a) értékei délben 122 és 133 % közé estek, ha a kapott eredményeket a reggeli 100 %-hoz viszonyítjuk. Becsléseink szerint a kl-a/kl-b aránynak 3,0-ről 2,65-re csökkenése az LHCII tartalom 25 %-os növekedésének felel meg. (Feltételeztük, hogy a változások kizárólag az LHCII tartalomban bekövetkező változásoknak köszönhetők, és a 2,65-ös kl-a/kl-b arány esetén a kl-a molekulák egyharmada az LHCII-höz kötődik.) A továbbiakban - a kl-a/kl-b arány mérésének egyszerűsége és mérési pontossága miatt - az LHCII tartalom változásait ezen egyszerű teszt segítségével jellemezzük ill. egyéb mérési adatainkat ezen arányhoz viszonyítjuk.

5.1.4. Cirkuláris dikroizmus

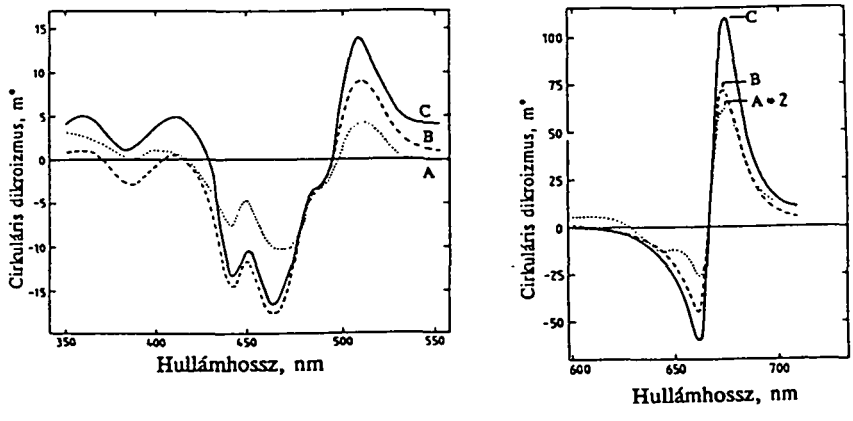
Ismerertes, hogy a PS2 partikulumok a tilakoid membránban királisan szervezett makrodoméneket alkotnak (ld. 2.3.2). Ehhez a kloroplasztiszok különböző CD anomáliái szolgáltatnak bizonyítékot. Minthogy az LHCII tartalom lényegesen befolyásolhatja a makrodomének nagyságát, CD mérésekből arra kaphatunk felvilágosítást, hogy az újonnan szintetizált LHCII komplexek beépülnek-e a makrodoménekbe vagy sem. Az előbbi

esetben a kl-a tartalomra normált CD nő, míg az utóbbi esetben a CD jelben változás nem várható. A 14. ábrán láthatjuk, hogy a bazális szegmentum esetén a CD jel amplitudója diurnális oszcillációt mutat, ami összefüggésbe hozható az LHCII felhalmozódás mértékének változásaival. Tehát az újonnan szintetizálódó komplexek beépülnek a makrodoménekbe, feltehetőleg növelik azok átmérőjét.



14. ábra: A 6 napos búza levelek bazális szegmentumából reggel (7 órakor), délben (13 órakor) és este (20 órakor) izolált kloroplasztiszok CD spektruma.

Érdekes megfigyelni (15. ábra), hogy az érettebb kloroplasztiszok anomális CD sávjainak amplitudója lényegesen magasabb, mint a bazális szegmentumban. Ezt a fejlettebb makrostruktúrának tudhatjuk be. Korábban Faludy-Dániel és Mustárdy zöldítési kísérletek során megfigyelte [85], hogy a CD jel nagysága nő az LHCII tartalommal.



15. ábra: 6 napos búza levelek bazális (A), középső (B) és felső (C) szegmentumaiból izolált kloroplasztiszok CD spektruma.

A különböző szegmentumok esetében mért CD értékeket a II. táblázat foglalja össze. Láthatjuk, hogy a CD változások oszcillációja a középső és felső szegmentumokban szintén jóval kisebb mértékű, hasonlóan az mRNS és az LHCII tartalom oszcillációjánál tapasztaltakhoz.

II. táblázat

Kloroplasztiszok két fő CD sávjának diurnális fluktuációja

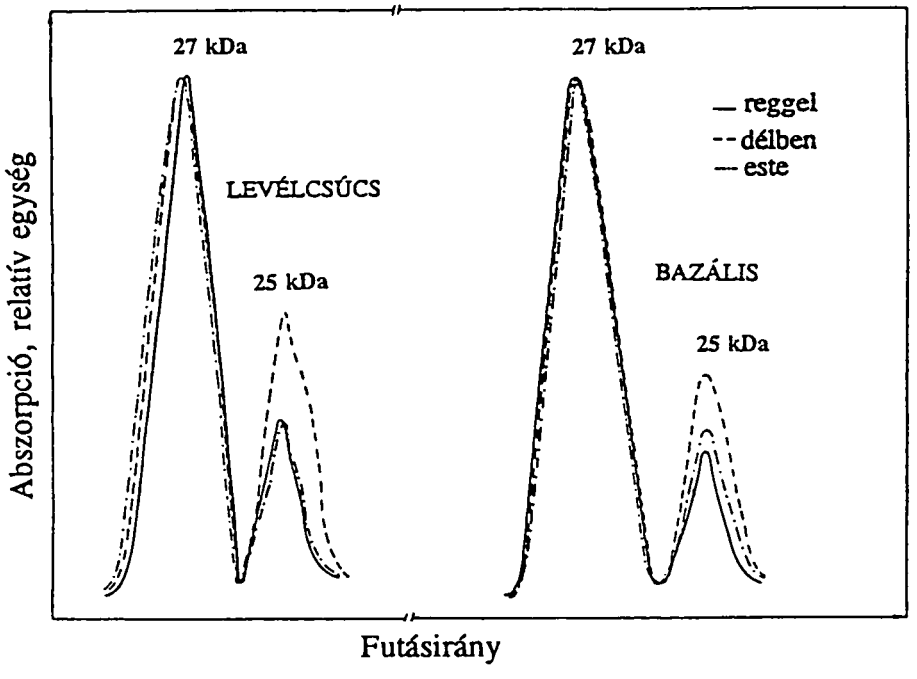
	Reggel		Délután	
	CD (683nm)	CD (506nm)	CD (683nm)	CD (506nm)
Bazális	38.7 ± 3.9	5.5 ± 0.8	48.6 ± 3.3	8.8 ± 1.3
Levélközép	93.4 ± 5.8	12.3 ± 1.2	97.4 ± 5.5	11.4 ± 1.2
Levélcsúcs	140.0±14.5	13.4 ± 1.3	131.0±11.8	12.9 ± 0.5

A kloroplasztiszokat 6 napos búza levelek különböző szegmentumaiból izoláltuk reggel ill. kora délután (7 ill. 14 órakor). A minták kl tartalma 20 μg/ml volt; a feltüntetett átlag- és szórásértékeket 5 független kísérletből számítottuk; a CD értékek m^o-ban értendők.

5.1.5. Az LHCII szubpopulációk analízise

Az LHCII két szubpopulációból áll: a belső és a perifériás antennából (ld. 2.3.2). A belső antenna a 27 kDa-os proteinben gazdag, míg a perifériás antennában a 25 kDa-os polipeptidek aránya magasabb. A hosszútávú akklimatizáció során ismeretes, hogy a

perifériás antenna mérete változik, és főként a perifériás antennát érinti a rövidtávú adaptációhoz kapcsolódó foszforiláció is. Kíváncsiak voltunk, hogy a genetikai szintű szabályozás, a diurnális oszcilláció során melyik antenna mennyisége nő meg a nap folyamán, ezért vizsgáltuk a 25 és 27 kDa-os polipeptidek mennyiségének változását. Ezzel rokonságot kerestünk a genetikai program és a hosszútávú akklimatizáció között. Az izolált tilakoid membránokat denaturáló gélen megfuttattuk, és a sávokat videodenzitométerrel analizáltuk.



16. ábra: 6 napos búza levelek bazális és felső szegmentumaiból reggel (6 órakor), délben (13 órakor) és este (21 órakor) izolált tilakoid membránok denaturáló géljének tipikus pásztázási képe. (Az LHCII 25 és 27 kDa-os polipeptidjeinek csúcsát ábrázoltuk).

A 16. ábrán látható, hogy az LHCII antenna két szubpopulációja nem egyenlő mértékben járul hozzá az LHCII napszaktól függő akkumulációjához. Láthatjuk, hogy a reggeli és a kora délutáni órák között a 27 kDa-os polipeptidekhez viszonyítva a 25 kDa-os polipeptidek aránya határozottan megnő. Délután ez a tendencia megfordul, és estére az LHCII fő komponense, a 27 kDa-os polipeptid ismét dominánssá válik.

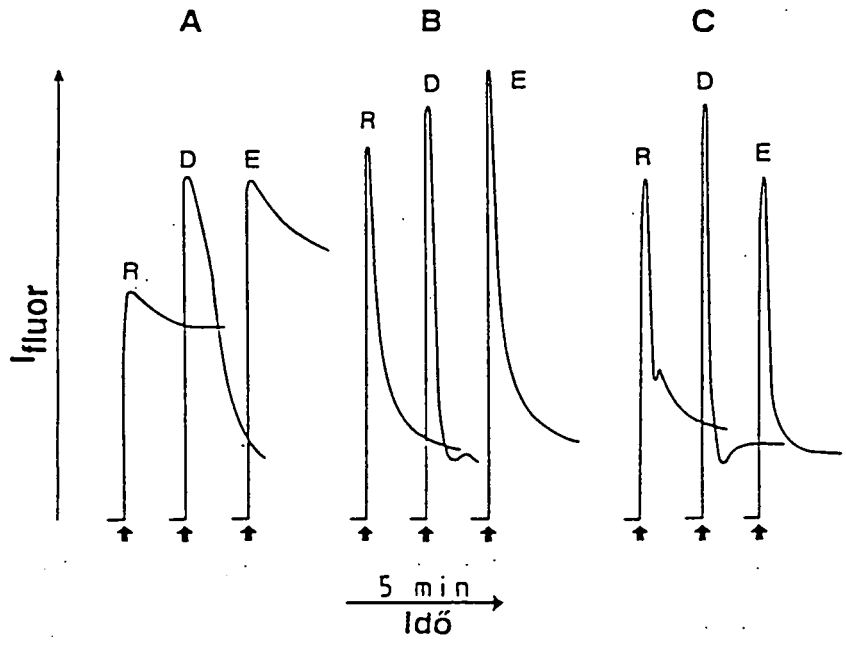
Érdekes megfigyelni, hogy ellentétben a kl-a/kl-b aránnyal, amely csak a bazális szegmentumban változik számottevően, a 25 kDa-os polipeptidek mennyiségének relatív növekedése a reggeli és a déli órák között a bazális és a felső levélrészekben kb. ugyanolyan mértékű.

5.2. Az LHCII diurnális ciklusának hatása a membránok funkciójára

Az 5.1 fejezetből már kiderült, hogy az LHCII mRNS szintjének oszcillációja tükröződik fehérje szinten is, az újonnan szintetizálódó molekulák beépülnek a tilakoid membránba, és a perifériás antenna méretét növelik. További kérdésként merült fel, hogy a diurnális oszcilláció érezteti-e a hatását a membránok funkcionális sajátságaiban is.

5.2.1. Kl-a fluoreszcencia indukció kinetika

A kloroplasztiszoknak azon képességét, hogy state tranzíció segítségével szabályozni tudják a gerjesztési energia megoszlását a két fotoszisztéma között, kl-a fluoreszcencia indukció kinetikai mérések segítségével követhetjük. A state tranzíció során a perifériás antenna komplexei foszforilálódnak, és disszociálnak a PS2 partikulumokról. Mivel az eddigi kísérleteink során is a perifériás antenna változásait tapasztaltuk, kézenfekvő volt a feltételezés, hogy a diurnális oszcilláció jelentkezni fog a state tranzícióban is. Feltevésünket a state 1-state 2 tranzícióra jellemző fluoreszcencia indukció mérésekkel igazoltuk (17. ábra).



17. ábra: Fluoreszcencia indukciós kinetikák 6 napos búzalevelek bazális (A), középső (B) és felső (C) szegmentumaiban reggel 7 órakor (R), délután 2 órakor (D) és este 9 órakor (E).

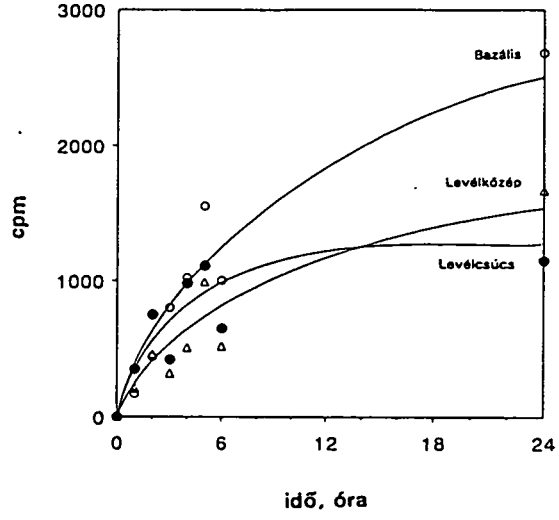
A fiatal levelek bazális szegmentumaiban a reggeli mintában a state 1-state 2 tranzíciós képesség hiányzott, míg délben gyors tranzíciót tapasztaltunk, hasonlóan a középső és felső szegmentumokhoz. Estére ez a képesség ismét eltűnt. A középső és felső szegmentumokban a változas kevésbé szembeötlő, de ott is látható, hogy a tranzíció a déli órákban felgyorsul.

Láthatjuk tehát, hogy a diurnális oszcilláció befolyásolja a kloroplasztiszok azon képességét, hogy state tranzícióval adaptálódjanak a megvilágítási viszonyok gyors változásaihoz.

5.2.2. *In vivo* foszforiláció

A state tranzíció összefügg az LHCII reverzibilis foszforilációjával (vö. 2.4.1), ezért megvizsgáltuk, hogy a diurnális oszcilláció megnyilvánul-e a tilakoid membránok foszforiláltsági szintjének napszakos változásában. Kísérleteink során ^{32}P izotóp segítségével követtük az LHCII foszforiláltságának mértékét a nap folyamán.

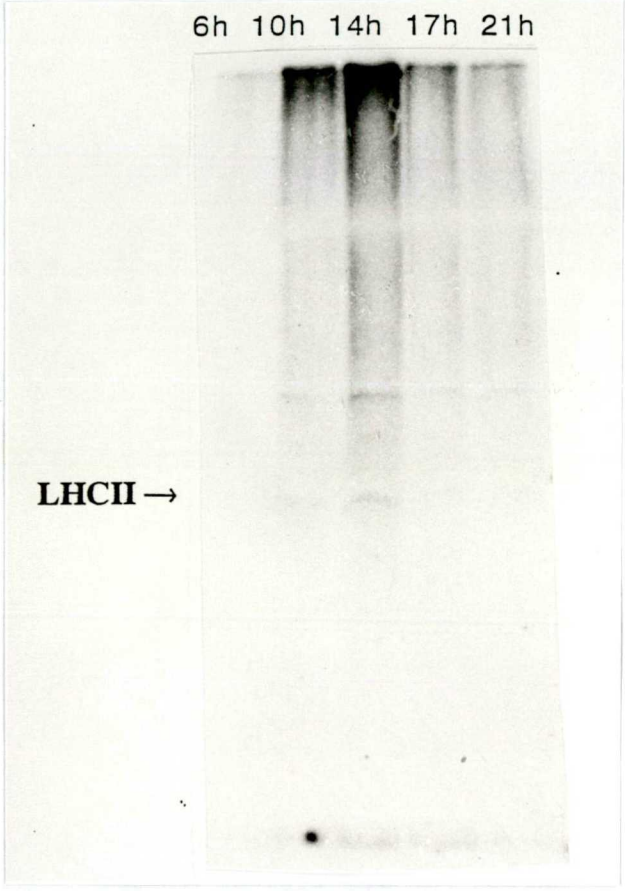
Ahhoz, hogy tudjuk, milyen jelölési időt kell alkalmaznunk a kísérletek során, megmértük a búza levelek egységnyi súlyra számított izotópfelvételi kinetikai görbéjét (18. ábra).



18. ábra: 6 napos búza levelek bazális, középső és felső szegmentumainak *in vivo* izotópfelvételi kinetikai görbéje.

Az ábrán láthatjuk, hogy az izotópfelvétel 24 óra elteltével telítést mutat, így az *in vivo* foszforilációs kísérletek során a 48 órával az izolálás előtt jelölt növényekben a foszfoproteinek radioaktivitása nem a jelölési idő függvénye. Az ábrából az is kitűnik, hogy a jelölődés mértéke a bazális szegmentumban a legnagyobb, majd rendre csökkenő tendenciát mutat a felső szegmentumok felé. Ez az eredmény valószínűleg azzal magyarázható, hogy a radioaktív izotóp felvétele először a bazális szegmentumba történik meg, és azon keresztül jut a levél magasabb szintjeire.

A diurnális oszcillációt vizsgáló kísérleteinkben egész levelekből izoláltunk tilakoid membránokat a nap folyamán öt alkalommal. A 19. ábrából kitűnik, hogy az *in vivo* foszforiláció mértékében is fellelhető a diurnális oszcilláció. Reggel alacsony a foszforiláció szintje, délben a legmagasabb, és estére ismét lecsökken.



19. ábra: 6 napos búza levelek *in vivo* foszforilációs szintje 6, 10, 14, 17 és 21 órakor.

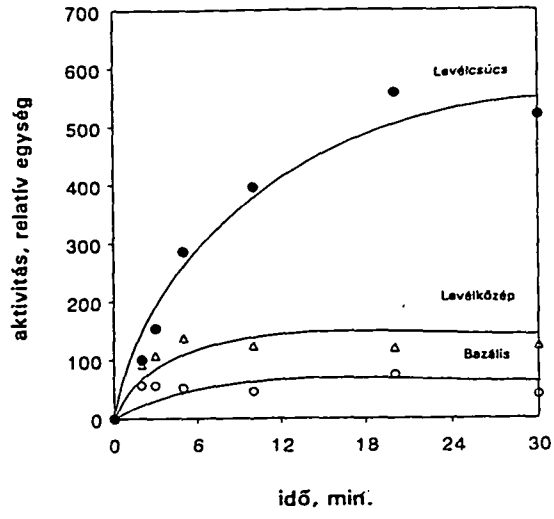
Kísérleteink tehát bizonyítékot szolgáltattak arra, hogy az LHCII foszforiláltságának mértéke napszakos ritmus szerint változik.

5.2.3. *In vitro* foszforiláció

Az *in vitro* foszforilációs kísérletek az LHCII foszforilálhatóságának megállapítására irányultak. Ebben az esetben mesterséges körülmények között

foszforiláltuk az izolált tilakoid membránokat. Az *in vitro* foszforiláció arra ad választ, hogy a teljesen defoszforilált állapotból az LHCII milyen foszforilációs szintet tud elérni.

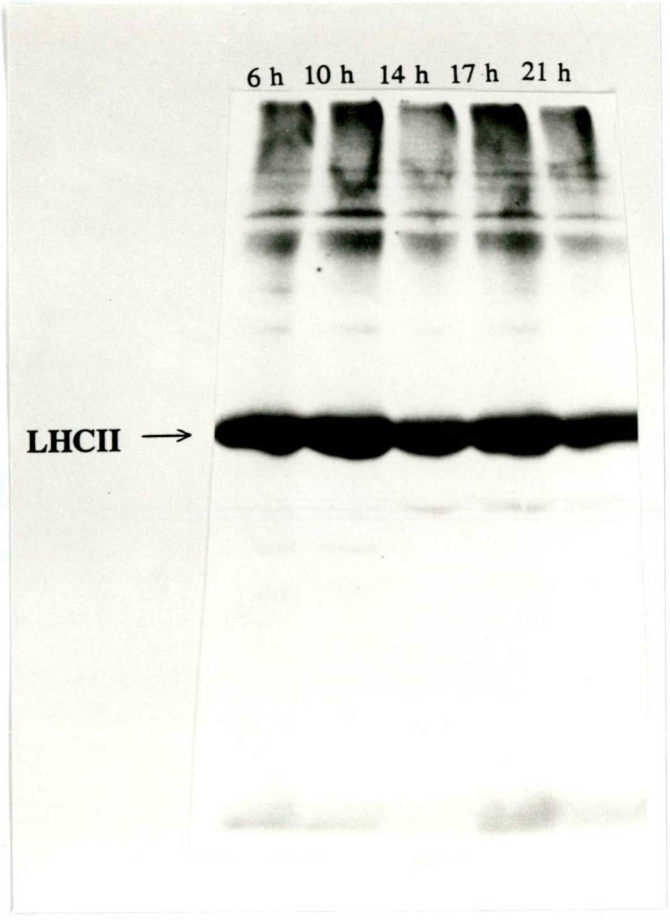
Először a foszforiláció kinetikai görbéjét vettük fel a különböző szegmentumok esetében (20. ábra).



20. ábra: 6 napos búza levelek bazális, középső és felső szegmentumaiból izolált tilakoid membránokban az LHCII *in vitro* foszforilációjának kinetikai görbéi.

Az ábrán látható, hogy a bazális és a középső szegmentumok esetében a kinetikai görbén már öt perc után telítés tapasztalható, míg a felső szegmentumban ez a telítés csak később következik be. Feltűnő az is, hogy a felső szegmentum jóval nagyobb mértékben képes foszforilálódni, mint a bazális és középső szegmentumok. Ennek magyarázatát még nem ismerjük.

Az *in vitro* foszforilációs mérések egész levelekből izolált tilakoid membránokból történtek. A 13. ábrából kitűnik, hogy az *in vitro* foszforiláció esetében a teljesen defoszforilált állapotból induló öt percig tartó $^{32}P\gamma ATP$-vel történő inkubálás ugyanolyan mértékű foszforilációt eredményez öt különböző időpontban a nap folyamán. Az *in vitro* foszforilációban tehát nem tapasztalunk diurnális oszcillációt.

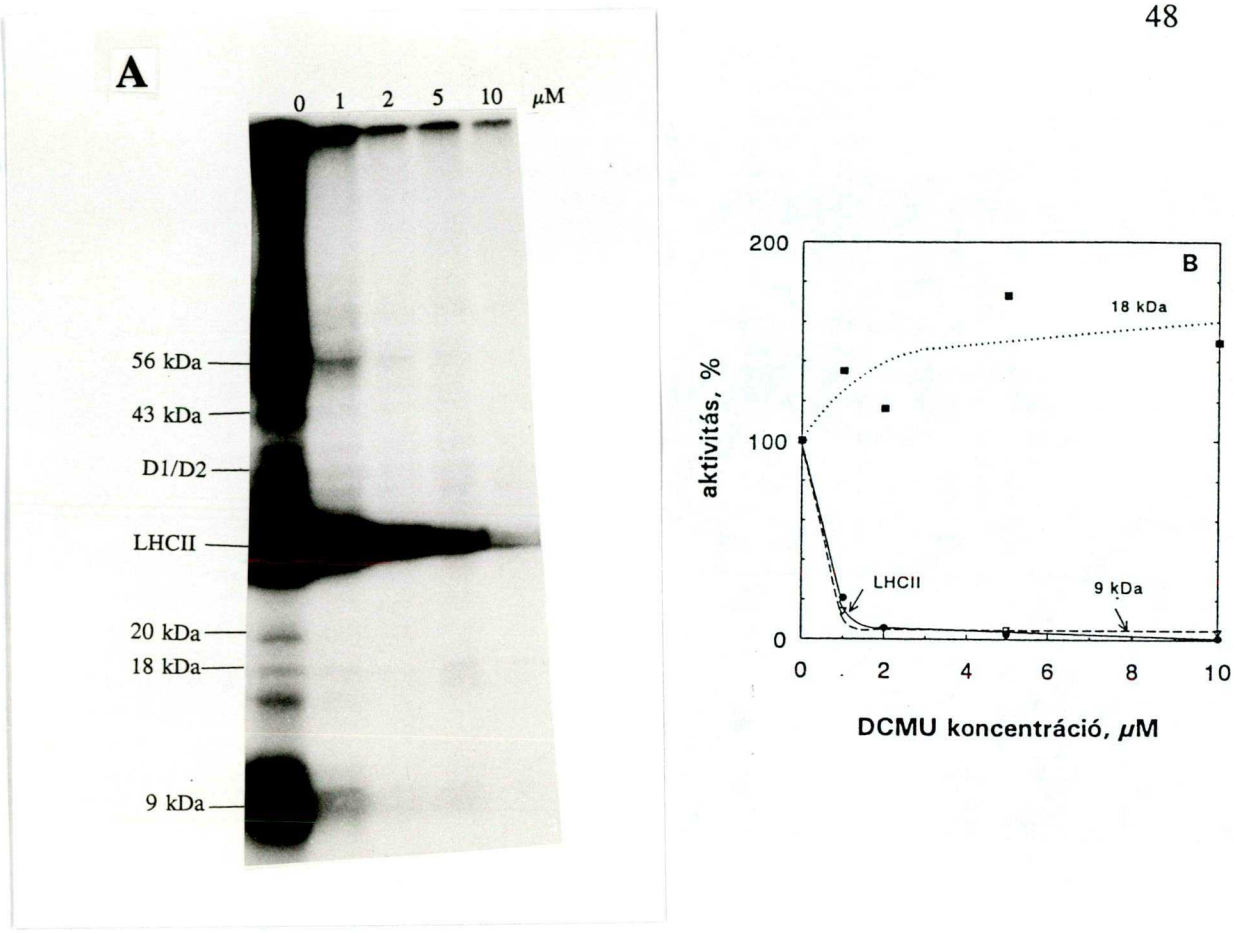


21. ábra: 6 napos búza levelek bazális, középső és felső szegmentumaiból 6, 10, 14, 17 és 21 órakor izolált tilakoid membránok *in vitro* foszforilálhatósági szintjei.

5.3. Gátlószerek hatása a tilakoid protein foszforilációra

A foszforiláció aktivációjának vizsgálatát gátlószerek alkalmazásával végeztük. Először a fényaktivációt vizsgáltuk DCMU-val, amely a Q_A és a Q_B között gátolja az elektrontranszportot, majd a cyt b_6/f komplex Q_o és Q_i oldali gátlószereinek alkalmazásával az aktiváció helyét szerettük volna meghatározni a cyt b_6/f komplexen belül.

Az irodalomban közölt adatokkal összhangban [63], úgy találtuk, hogy a DCMU, gátolta a legtöbb polipeptid foszforilációját a tilakoid membránban (22. ábra).



22. ábra: A DCMU hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára. A: autoradiogram, B: tipikus titrálási görbék.

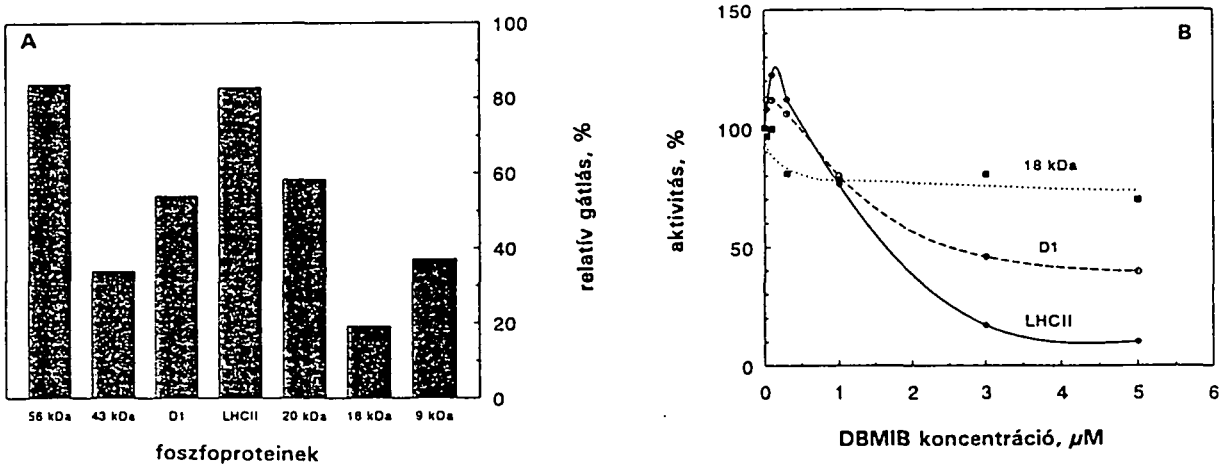
Bennett eredményeihez képest a mi eredményeink annyiban jelentenek újat, hogy mi az összes foszfoimagerrel detektálható foszfoproteint vizsgáltuk. A titrálási görbén láthatjuk, hogy a 7 legintenzívebben foszforilálódott protein közül 6 foszforilációjának mértéke egyértelműen a DCMU koncentráció függvénye. (Az LHCII és a 9 kDa-os foszfoproteint a 22.B ábrán láthatjuk.) Érdekes az az új megfigyelés is, hogy a 18 kDa-os protein foszforilációja viszont nem gátolható DCMU-val.

A Q_o oldali gátlószerek közül a DBMIB-t, a stigmatellint és a bromanilt vizsgáltuk.

3 μM DBMIB hatására csaknem teljesen gátolható volt az LHCII foszforilációja, míg a 9 kDa-os protein foszforilációja sokkal kisebb érzékenységet mutatott. Ez szintén összevethető az irodalomban található eredményekkel [86]. Adataink szerint 3 μM DBMIB

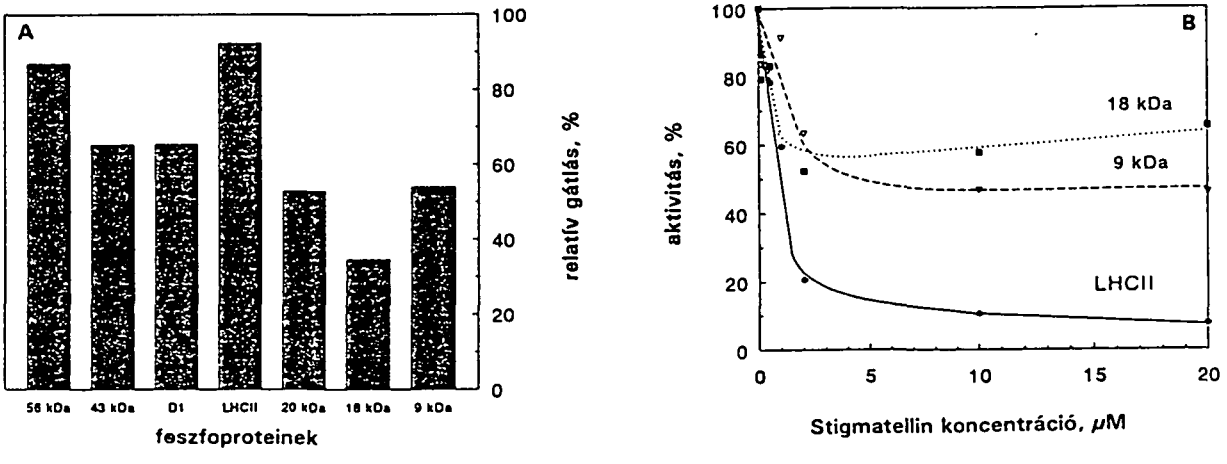
hatására az 56 kDa-os polipeptid foszforilációval szembeni érzékenysége az LHCII-höz volt hasonló, míg a D1/D2, a 43 és 20 kDa-os proteinek kisebb érzékenységet mutattak (23.A ábra). A 18 kDa-os fehérje foszforilációja DBMIB-vel sem volt gátolható.

Ezen adatok azt sugallják, hogy a foszfoproteinek három csoportba oszthatók. A három foszfoprotein csoport képviselőinek tipikus titráló görbéi a 23.B ábrán láthatók.



23. ábra: A DBMIB hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára. A: 3 μM DBMIB hatására bekövetkező gátlás mértéke %-ban kifejezve a különböző foszfoproteinek esetében. B: Tipikus titrálási görbék.

Stigmatellinnel, ami a cyt b_6/f komplex Q_o helyenek egy hatásos antibiotikum tipusú gátlószere [87], az LHCII és az 56 kDa-os protein foszforilációja jól gátolható (24.A ábra).



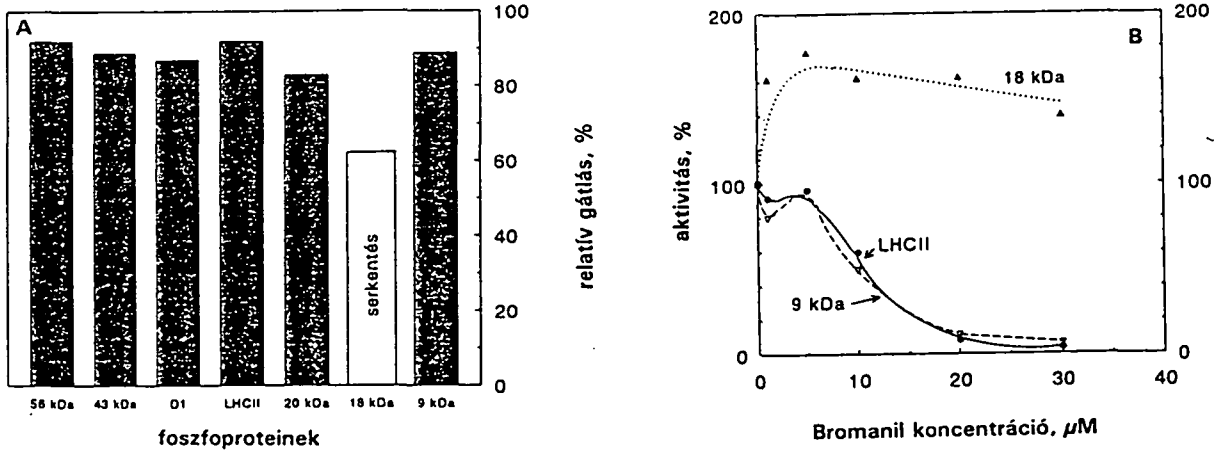
24. ábra: A stigmatellin hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára. A: 20 μM stigmatellin hatására bekövetkező gátlás mértéke %-ban kifejezve a különböző foszfoproteinek esetében; B: tipikus titrálási görbék.

Az LHCII esetében az I_{50} értéket 1 és 2 μM közé becsülhetjük (24.B ábra). Az 56 kDa-os protein esetében ehhez hasonló értéket kaptunk (nincs ábrázolva).

A proteinek második csoportjának (D1/D2, és a 43, 20 és 9 kDa-os proteinek) foszforilációja, amely DBMIB-vel szembeni érzékenysége kisebb volt, mint az LHCII-é, stigmatellinnel szintén kevésbé volt gátolható (24.A ábra). A titrálási görbék összehasonlításakor láthatjuk, hogy a 9 kDa-os protein esetében csak fele akkora gátlást tapasztalunk, mint az LHCII foszforilációja estében.

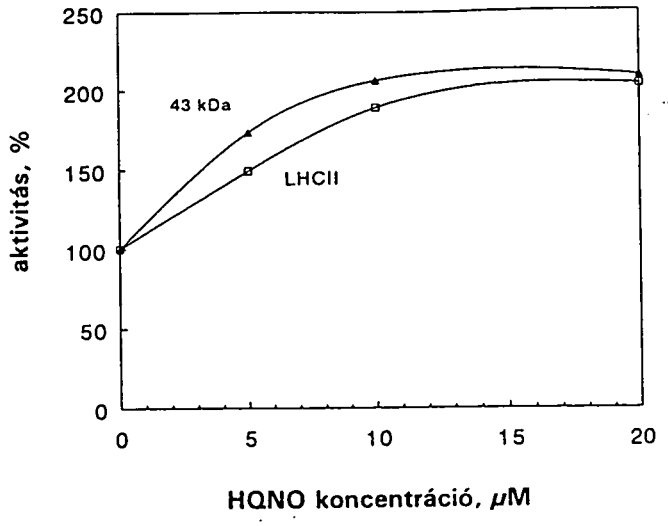
A 18 kDa-os protein foszforilációja volt a legkevésbé érzékeny a stigmatellinnel szemben, bár összehasonlítva a DCMU-val és a DBMIB-vel, a stigmatellinnél kismértékű gátlás volt észlelhető.

A bromanil, mely egy halogenilált 1,4-benzokinon és a cyt b_6/f komplex Q_o helyének gátlószere [88], gátolta az összes vizsgált foszfoprotein foszforilációját, kivéve a 18 kDa-osét, amely esetében egyértelmű serkentést tapasztalhattunk (25.A ábra).



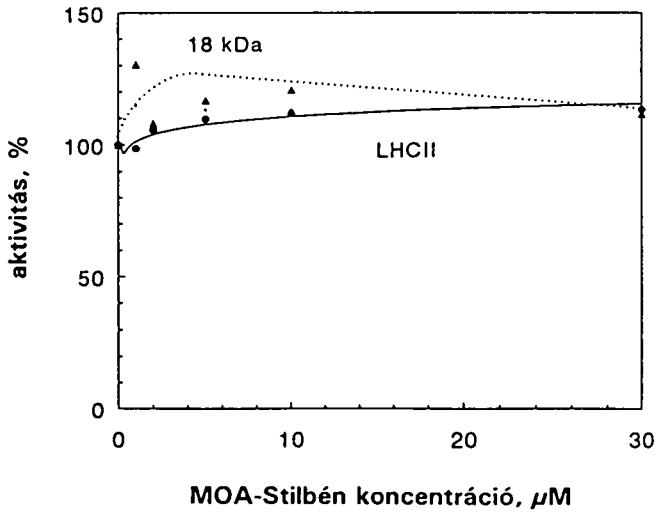
25. ábra: A bromanil hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára. A: 20 μM bromanil hatására bekövetkező gátlás mértéke %-ban kifejezve a különböző foszfoproteinek esetében; B: tipikus titrálási görbék.

A HQNO egy kinon analóg vegyület, amely a cyt b_6/f komplex Q_i helyén gátol [89]. Ez a gátlószer az eddigiekkel ellentétben egyértelműen serkentette az LHCII és a többi foszfoprotein foszforilációját a tilakoid membránban (26. ábra)



26. ábra: A HQNO hatása az LHCII a 18 és a 9 kDa-os protein foszforilációjára.

A MOA-stilbén-t nemrégiben vezették be mint a cyt b_6/f komplex Q_i helyének gátlószerét [90]. Ez a gátlószer nem bizonyult hatásosnak a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára (27. ábra).



27. ábra: A MOA-stilbén hatása az LHCII és a 18 kDA-os protein foszforilációjára

Megállapíthatjuk tehát, hogy míg a Q_o oldali gátlószerek gátolják a tilakoid membránokban a foszforilációt, addig a Q_i oldali gátlószerek hatástalannak bizonyultak, vagy serkentettek.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A növényekben többszintű regulációs mechanizmus működik (ld. 2.4. fejezet). A fényintenzitásbeli változásokra a növények viszonylag gyorsan válaszolnak a rövidtávú adaptációs mechanizmusuknak köszönhetően, amelyben az LHCII reverzibilis foszforilációja kulcsszerepet játszik. A növénynevelés során alkalmazott fényintenzitáshoz a hosszútávú akklimatizációval alkalmazkodnak, melynek során az LHCII mérete változik a körülményeknek megfelelően. Ismeretes volt, hogy az LHCII-ért felelős gének expresszióját egy biológiai óra is szabályozza. Munkánk során bizonyítékot szolgáltattunk arra, hogy a cirkadián ritmus napszakos ingadozást okoz az LHCII mennyiségében, és befolyásolja a tilakoid membránok funkcionális sajátságait is.

6.1. Az antennaszerkezet napszakos változásai, összefüggés az LHCII genetikailag programozott diurnális ciklusával

Korábban az LHCII diurnális oszcillációját csak mRNS szinten vizsgálták [49]. Mi a levelek szegmentumokra bontásával vizsgálni tudtuk az oszcillációt egy fejlődési grádiens mentén is, másrészt kísérleteink kiterjedtek az oszcilláció fehérje szintű vizsgálatára is.

Nagy és mtsi szerint [49] a Cab1 gén mRNS szintje legmagasabb délelőtt 10 óra és déli 12 óra között. Ehhez az eredményhez képest adataink abban nyújtanak új információt, hogy az mRNS szint változásait nem egész levélen, hanem a levelek három szegmentumán vizsgáltuk. A bazális szegmentumban legmagasabb az mRNS mennyisége, a középső szegmentumban kisebb a jelölődés, de az oszcillációs kép a bazális

szegmentumban tapasztaltakkal megegyező. Lamppa és mtsi-val megegyezően [91] a felső szegmentumban nem volt kimutatható mennyiségű mRNS.

Az mRNS mennyiségének oszcillációja fehérje szinten is tükröződött, amit egyrészt a kl-a/kl-b arány meghatározásával, másrészt pedig natív gélelektroforézis segítségével is bizonyítottunk. A natív gélek pásztázásakor kapott eredmények megerősítették, hogy a kl-a/kl-b arány csökkenése a déli órákra az LHCII pigment-protein komplexeinek akkumulációjával magyarázható. A kl-a/kl-b moláris arány vizsgálatakor az LHCII reggeltől délig történő akkumulációjára vonatkozó becslés jól összevethető a natív gélek pásztázásakor kapott értékekkel.

Az LHCII mennyiségének oszcillációja tehát összeegyeztethető az mRNS oszcillációs képével. Az mRNS esetében már reggel elég magas értéket kaptunk, míg az LHCII szint csak délben érte el a maximumot. Ez az eltolódás nyilvánvalóan abból fakad, hogy az LHCII mennyiségének felhalmozódása csak egy hosszabb periódus után válik mérhetővé. Továbbá az LHCII mennyiségének növekedése várhatóan mindaddig folytatódik, amíg az mRNS szint az átlagosnál magasabb. Az LHCII összmennyiségének diurnális oszcillációját délutáni maximummal, antitest segítségével is kimutatták [92].

Az LHCII mennyisége és mRNS-ének szintje között tehát jó korreláció állítható fel. Természetesen sötétben tartott levelek esetén a kl-a/kl-b arányban nincs oszcilláció. Ezzel szemben az mRNS szint oszcillációja több napi sötétben tartás után is folytatódik a cirkadián ritmus szerint [49]. Az LHCII mennyiségi változásai tehát nem cirkadián, hanem diurnális jellegűek.

Az újonnan szintetizálódott LHCII komplexek a CD mérések tanúsága szerint beépülnek a makrodoménekbe.

A búza levelek bazális, középső és felső szegmentumaiból izolált kloroplasztiszok CD spektrumai nagyon hasonlítanak egymásra (15. ábra). Mindegyik mutatja az érett gránumos kloroplasztiszokra jellemző nagy CD jelet (vö.[93]), amelyről kimutatták, hogy a pigment-protein komplexek helikálisan szervezett makrodoménjeiből ered ([31,35,93-95]. Mivel ez a jel mindegyik szegmentum esetén megjelenik, ez arra utal, hogy a pigment-protein komplexek makroorganizációja nagyon hasonló a különböző mintákban. Mindazonáltal a fő sávok amplitudója a felső szegmentum esetében jóval nagyobb, ami valószínűleg a makrodomének méretével magyarázható, és azt mutatja, hogy az érettebb kloroplasztiszokban a pigmentrendszerek makrodomén szerveződése kifejezettebb, mint a merisztemikus szövetekben [31,96].

Az Eredmények c. fejezetben a 14. ábrából és a II. táblázatból kitűnik, hogy a CD jel amplitudója is diurnális oszcillációt mutat. Ez az oszcilláció is sokkal kisebb mértékű a felső és középső szegmentumok esetén, mint a levél alsó részében.

A CD jelet a szuszpenzió klorofill tartalmára normáltuk, így biztosak lehetünk benne, hogy nem a kl molekulák akkumulációja okozza a napszakos ingadozást. Mivel a kloroplasztisz intenzív CD-je a pigment-protein komplexek helikálisan szerveződött makrodoménjeiből származik [31,94], ezért a fő CD sávok amplitudójának fluktuációja a pigment-protein komplexek makroorganizációjának változásainak tulajdonítható. Különösen a bazális szegmentumban a reggeli és déli órák között bekövetkező CD jel növekedés mutatja azt, hogy az újonnan szintetizálódó LHCII molekulák beépülnek a már meglevő makrodoménekbe, vagy maguk alkotnak ilyen makrodoméneket a tilakod membránban.

Az irodalmi bevezetőben már szóltam arról, hogy míg a belső LHCII populáció főleg 27 kDa-os polipeptidekből áll, addig a belső populációban főleg a 25 kDa-os polipeptid részaránya a magasabb. Arra a kérdésre, hogy az LHCII két szubpopulációjából

melyiket érintik a változások, a belső vagy a perifériás antenna komplexei szintetizálódnak-e a nap folyamán, az LHCII szubpopulációk analízise nyújtott információt. Mivel azt tapasztaltuk, hogy a 25 kDa-os polipeptidek mennyisége nőtt meg a déli órákra a nap folyamán, azt a következtetést vontuk le, hogy elsősorban a perifériás antenna komplexei szintetizálódnak a diurnális ciklus során. Ezen eredmények segítségével bizonyíthatjuk azt is, hogy az LHCII perifériás komplexei fontos szerepet játszanak a makrodomének felépítésében. A perifériás antenna komplexei valószínűleg sokkal könnyebben aggregálódnak, mint a belső antenna komplexei.

Az adaptációs folyamatok az LHCII perifériás antenna komplexeit érintik elsősorban. A rövidtávú adaptációnál a perifériás antenna foszforilálódik, majd disszociál, a hosszútávú akklimatizáció során a perifériás antenna mérete nő meg a belső antenna méretéhez képest. A diurnális ciklus során szintén a perifériás antenna komplexei szintetizálodnak elsősorban, így arra a következtetésre juthatunk, hogy a diurnális ciklus rokon vonásokat mutat a hosszútávú akklimatizációhoz, vagy része annak.

6.2. A diurnális ciklus hatása a membránok funkciójára.

Mint az előzőekben láttuk, a diurnális ciklus során megváltozik a membránok összetétele és az antenna rendszer makroorganizációja. Délre megnő az LHCII tartalom, ezzel együtt a perifériás antenna mérete, és valószínűleg a makrodomének mérete is megnő.

A fluoreszcencia indukciós mérések arra engednek következtetni, hogy a membránoknak nemcsak a szerkezete, hanem a funkciója is megváltozik a nap folyamán.

A bazális levélrészekben az oszcilláció fellelhető a state 1-state 2 tranzíció változásban is. A fluoreszcencia ilyen, a levelek előmegvilágítását követő változása az LHCII-vel hozható kapcsolatba [97]. A leveleken mérhető state tranzíció segítségével sikerült bizonyítanunk, hogy párhuzamosan az LHCII akkumulációjával és beépülésével a makrodoménekbe, a levelek bazális része az érettebb levéldarabok funkciójához kezd hasonlítani. A megfigyelt változások minden bizonnyal összefüggenek az újonnal szintetizálódó LHCII komplexek jelenlétével, ill. beilleszkedésével az antennarendszerbe.

A fluoreszcencia mérések eredményei jól korrelálnak az LHCII-t érintő diurnális fluktuációkkal (mRNS szint, kl-a/kl-b arány, LHCII tartalom és CD amplitudók). Ez alapján állíthatjuk, hogy a diurnális oszcilláció érvényre jut az LHCII funkcionális sajátságaiban is, nevezetesen a membránok azon képességében, hogy state tranzíciós változásokon menjenek keresztül.

Másfelől a fluoreszcencia hozamban történő változások az LHCII reverzibilis foszforilációjával és a membránban történő laterális diffúziójával hozhatók kapcsolatba [98,99]. Ezért vizsgáltuk az LHCII *in vivo* és *in vitro* foszforilációját is a nap folyamán.

Kísérleteinkből kiderült, hogy az *in vivo* foszforiláció (ld. 5.2.2.) kapcsolatba hozható a genetikai regulációval. A foszforiláció mértéke napszakos ingadozást mutat. Levelekben a legintenzívebb foszforilációt a déli órákban mértünk, és a foszforiláció mértéke az esti órákban volt a legalacsonyabb - jóllehet a megvilágítás erőssége állandó volt.

Ugyanakkor, *in vitro* foszforiláció során nem tapasztaltunk diurnális oszcillációt. Tehát a különböző időpontokban izolált tilakoid membránok foszforilálhatóságának mértéke nem követi azt a változást, amit levelekben tapasztaltunk.

A levelekben és az izolált tilakoid membránokban mért adatokat összevetve azt a következtetést vonjuk le, hogy a levelekben mérhető foszforilációs különbségek közvetlenül nem vezethetők vissza az LHCII tartalomban és összetételben bekövetkező változásokra. Más szavakkal a foszforiláció *in vivo* regulációjáért nem a szubsztrát mennyisége vagy összetétele a felelős.

Ez látszólag ellentmond annak, hogy a különböző szegmentumokból izolált tilakoid membránok foszforilálhatóságának mértéke szignifikánsan különbözött egymástól (20. ábra). Valószínűnek tűnik azonban, hogy az eltérő foszforilációs kapacitásért nem az LHCII tartalomban meglévő különbségek tehetők felelőssé, hanem a fejlődési grádiens, azaz a kloroplasztiszok fejlettségének levélszintenkénti különbözősége. Ez a fejlődési grádiens okozhat különbséget pl. a kinázok mennyiségében vagy a cyt b_6/f komplex aktivitásában.

Valószínűtlen, hogy a levelekben és izolált tilakoid membránokon kapott eredmények különbözőségéért az LHCII defoszforilációja lenne felelős. Az *in vivo* kísérletek során a leveleket rögtön jégre tettük, így megakadályoztuk a defoszforilációt; az izolálást pedig NaF jelenlétében végeztük, amely gátolja a foszfatáz aktivitását. Az *in vitro* végzett foszforiláció során az izolált tilakoid membránokat először sötétben inkubáltuk, így teljesen defoszforiláltuk azokat, majd NaF jelenlétében foszforiláltuk.

Az *in vivo* és *in vitro* eredmények különbözőségének magyarázatánál figyelembe kell vennünk, hogy az *in vivo* foszforilációs kísérletek a növényekben egy adott pillanatban a foszforiláció mértékéről adnak felvilágosítást, míg az *in vitro* foszforilációs kísérletek alapján az LHCII foszforilálhatóságának mértéke állapítható meg.

Az *in vivo* foszforiláció napszakos ingadozásának egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy az LHCII felhalmozódása miatt ugyanazon fényintenzitás magasabb

foszforilációs szintet okoz. A PS2 antenna méretének növekedésével ui. a fotoszintézis közelebb kerülhet a telítéshez, s ezzel a PQ molekulahalmaz redukáltsági szintje megnőhet. Ez a magyarázat - bár nem zárható ki - azért nem valószínű, mert a foszforiláció napszakos ingadozása egész leveleken is megfigyelhető, míg az LHCII mennyiségének változása az egész levélen nehezen detektálható.

Több nukleárisan kódolt proteinről tudjuk, hogy expressziójukat ill. a protein mennyiségét cirkadián ritmus szabályozza [100]. Elképzelhető, hogy ezek valamelyike befolyásolja az elektrontranszport sebességét, és ezzel a kináz aktivitását. A legkézenfekvőbb magyarázat az lenne, ha a cyt b_6/f vagy a Rubisco aktivitása mutatna napszakos ingadozást, mert így a kináz aktivitása közvetlenül, vagy a teljes elektrontranszport sebességén keresztül közvetve befolyásolható lenne. A cyt f mennyiségét azonban nem kontrollálja a cirkadián ritmust. A Rubisco (magban kódolt) kis alegységéről kimutatták, hogy az mRNS szintje cirkadián ritmus szerint változik [92]. Viszont a Rubisco nagy alegysége, amely kloroplasztiszban kódolt, nem mutat cirkadián ritmust. Ezért valószínűtlen, hogy a Rubisco mennyisége változna. A CO_2 fixálás sebessége azonban változhat a nap folyamán [101]. (Ez a lehetőség a cyt b_6/f esetében sem zárható ki.) Az LHCII napszakos ingadozása ezzel akkor kerülhet összefüggésbe, ha a két foszforilációs mechanizmus valahogy egymáshoz kapcsolt. Bár erre nincsen adatunk, feltételezhető, hogy a különböző - a kloroplasztiszban és a citoplazmában is nagy számban előforduló - proteinek foszforilációja egymással összehangolt módon megy végbe.

A foszforiláció az állatvilágban igen fontos szerepet játszik a szignál transzdukciós folyamatokban. Növényekben, a kloroplasztiszban erre még nincs bizonyíték. A jelenleg elfogadott elmélet szerint a foszforiláció elsődleges szerepe a két fotoszisztéma közötti energiamegoszlás szabályozásában van [43]. Napvilágot láttak azonban már olyan

hipotézisek is, amelyek a foszforiláció szignál transzdukcióban betöltött szerepére utalnak [102].

Az LHCII polipeptidjei a magban vannak kódolva, az LHCII pedig a kloroplasztiszban, a tilakoid membránban foglal helyet. A diurnális oszcilláció viszont mindkét helyen fellelhető. A két kompartmentum között kapcsolatot teremthetne egy foszforiláción alapuló szignál transzdukciós lánc. Ez *in vivo* foszforilációs eredményeink magyarázatát nagyban megkönnyítené. Ezen feltételezés igazolására azonban több bizonyítékra lenne szükség. Egy ilyen szignál transzdukciós lánc feltárásához az LHCII-vel kapcsolt diurnális ciklus segítségünkre lehet.

6.3. Gátlószerek hatása a tilakoid membrán proteinek foszforilációjára

Tilakoid membránokban a kináz fény, vagy olyan redukáló anyagok hatására aktiválódik, amelyek redukálják a PQ molekulákat, tehát a kináz aktivitás szorosan kapcsolódik a fotoszintetikus elektrontranszporthoz [63]. A fényaktivációt tehát olyan gátlószerek segítségével vizsgálhatjuk, amelyek képesek az elektrontranszport megszakítására. Ilyen gátlószer pl. a DCMU, amely a Q_A és a Q_B között szakítja meg az elektrontranszportot [63].

Ismeretes, hogy az LHCII kináz a cyt b_6/f komplexen keresztül aktiválódik (ld. 2.5 fejezet), bár ennek a pontos helyét még nem ismerjük. A cyt b_6/f komlexnek léteznek olyan gátlószerei, amelyek hatnak a tilakod membrán proteinek foszforilációjára is. Ezen gátlószerek hatásának vizsgálata segitséget nyújthat a kináz aktivációs hely pontosabb meghatározásában. Az irodalomban található eredményekhez képest a mi méréseink

annyiban jelentenek újat, hogy egyrészt szisztematikusan vizsgáltuk a különböző gátlószerek foszforilációra gyakorolt hatását, másrészt nemcsak a legnagyobb mértékben foszforilálódó proteineket, az LHCII-t és a 9 kDa-os proteint, hanem az összes foszfoimagerrel detektálható foszfoproteint vizsgáltuk. A dolgozatomban ezek közül a foszfoproteinek közül a 7 legintenzívebben foszforilálódóval foglalkozom részletesen.

A fényaktiváció vizsgálatakor a DCMU-val kapott eredményeink újdonsága az irodalmi adatokhoz képest [63] az, hogy az összes foszfoproteinnel ellentétben a 18 kDa-os protein foszforilációja nem volt gátolható DCMU-val. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a 18 kDa-os proteint nem az LHCII kináz foszforilálja, mivel az elektrontranszport megszakítása nem eredményezte a kináz aktiváció gátlását.

A Q_o-oldali gátlószerek (DBMIB, stigmatellin, bromanil) mind gátolták a foszforilációt az összes foszfoprotein esetében, kivéve a 18 kDa-os foszfoproteint. A DBMIB és a stigmatellin foszforilációra gyakorolt hatása alapján a foszfoproteineket három csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba az LHCII és az 56 kDa-os protein, a második csoportba a 43 kDa-os, D1/D2, 20 kDa-os, 9 kDa-os proteinek, míg a harmadik csoportba tulajdonképpen csak egy, a 18 kDa-os protein tartozik.

Mind a DBMIB, mind a stigmatellin esetében a foszforilációra vonatkozó I_{50} értékek magasabbak voltak (1 és 2 μM között), mint a cyt b_6/f komplex aktivitására vonatkozó I_{50} értékek, amik az irodalom szerint 50 nM körül vannak [87,88]. Hasonló jelenség tapasztalható az LHCII kináz DCMU-val történő gátlása esetén (vö. [86]).

A bromanil némiképp eltérően viselkedett a többi Q_o-oldali gátlószerhez képest. A 18 kDa-os protein kivételével gátolta az összes foszfoprotein foszforilációját. A gátlás mértékében azonban nem volt különbség. Ezen gátlás I_{50} értéke kb. 12 μM volt (vö. 25.A ábrával), amely szintén egy nagyságrenddel nagyobb, mint ami a lineáris elektron

transzport esetében tapasztalható [103]. Meg kell azonban jegyezni, hogy ennél a gátlószer koncentrációnál a bromanil kovalensen kötődik a tilakoid membránhoz, ezért az elektrontranszport irreverzibilisen gátlódik [103]. Feltehetőleg ezzel magyarázható, hogy a foszfoproteinek első és második csoportja között miért nem tudunk különbséget tenni a bromanil esetében. A bromanil igen erőteljesen serkentette a 18 kDa-os protein foszforilációját, míg a DBMIB és a stigmatellin nem volt hatással a foszforilációra.

A 18 kDa-os foszfoproteint ezideig nem azonosították. Nem zárható ki, hogy ez a protein azonos a cyt b_6/f komplex 17 kDa-os polipeptidjével [4].

A cyt b_6/f komplex Q_i-oldali gátlószerei, a HQNO és a MOA-stilbén nem gátolták a tilakoid protein foszforilációt, sőt a HQNO esetében jelentős serkentetést is tapasztaltunk. A HQNO-ról kimutatták, hogy a cyt b_6 molekulák középponti potenciálját -150 és -30 mV-ról -34 és +57 mV-ra növeli [104] és jelentősen növeli a cyt b_6 fotoredukcióját [103]. Korábban úgy tartották, hogy a HQNO nincs hatással a foszforilációra [105]. Másrészt viszont az NQNO-ról, mely ugyanott gátolja a cyt b_6/f komplexet, mint a HQNO [88], kimutatták, hogy az LHCII foszforilációját mintegy 40 %-kal növelte [78]. A HQNO-val ellentétben a MOA-stilbén nincs hatással a cyt b_6 potenciáljára, és csak kismértékben befolyásolja ezen molekulák villanófény indukált redukcióját. Vélhető tehát, hogy a serkentés a potenciál eltolódással, nem pedig a Q_i oldali gátlással hozható összefüggésbe.

A cyt b_6/f komplex Q_o ill. Q_i-oldali gátlószerei eltérő hatásúak a tilakod membrán proteinjeinek foszforilációjára. Mivel a HQNO és a MOA-stilbén nem gátolták a tilakoid protein foszforilációt, arra következtethetünk, hogy a kináz aktiváció a cyt b_6/f komlpex Q_o helyénél, vagy ez után, de mindenképpen a Q_i hely előtt történik meg.

7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a Cab1 gén expresszióját szabályozó cirkadián ritmus - búza csíranövények merisztemikus levélszegmentumaiban - jól detektálható napszakos változást eredményez a tilakoid membránok LHCII tartalmában. Kimutattuk továbbá, hogy a nap folyamán újonnan szintetizálódó antenna molekulák beépülnek a PS2 partikulumok alkotta makrodoménekbe. A polipeptidek analízíse arra az eredményre vezetett, hogy a napszakos ingadozás elsősorban az LHCII perifériás komplexeit érinti, hasonlóképpen a hosszútávú akklimatizációhoz. Ezek a komplexek segítik a partikulumok makroorganizációját.

A diurnális oszcilláció nemcsak a membránok összetételének és szerkezetének változásaiban nyilvánul meg, de együtt jár funkcionális változásokkal is. A state tranzíció sebessége és a foszforiláció mértéke is diurnális oszcillációt mutat, ami a növények rövidtávú adaptációs képességének diurnális regulációjára utal.

Gátlószeres vizsgálatainkból kiderült, hogy a kináz a cyt b_6/f komplex Q_o és Q_i helye között aktiválódik. A foszfoproteineket a Q_o oldali gátlószerekkel szembeni érzékenységük alapján három csoportba sorolhatjuk.

IRODALOMJEGYZÉK

1 Junge, W. (1977) Photosynthesis I., Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation (Trebst, A. és Avron, M., szerk.), pp. 59-93, Springer-Verlag, Berlin.

2 Mitchell, P. (1975) FEBS Lett. 56, 1-6.

3 Mitchell, P. (1976) J. Theor. Biol. 62, 327-367.

4 Malkin, R. (1992) Photosynthesis Res. 33, 121-136.

5 Bendall, D.S. és Manasse, R.S. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1229, 23-38.

6 Barber, J. és De Las Rivas, J. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10942-10946.

7 Mitchell, P. (1979) Science 206, 1148-1159.

8 Golbeck, J.H. (1992) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 293-324.

9 Fish, L.E., Kuck, U. és Bogorad, L. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1413-1421.

10 Sárvári, E., Nyitrai, P. és Gyüre, K. (1984) Photochem. Photobiol. 8, 229-237.

11 Lam, E., Oritz, W., Mayfield, S. és Malkin, R. (1984) Plant Physiol. 74, 650-655.

12 Andersson, B. és Styring, S. (1991) Curr. Topics in Bioenerg. 16, 1-81.

13 Nanba, O. és Satoh, K. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 109-112.

14 Green, B.R. (1988) Photosynthesis Res. 15, 3-32.

15 Henryson, T., Schroder, W.P., Spangfort, M.D. és Akerlund, H.-E. (1988) Biochim. Biophys. Acta 977, 301-308.

16 Camm, E.L. és Green, B.R. (1989) Biochim. Biophys. Acta 974, 180-184.

17 Kühlbrandt, W. (1987) J. Mol. Biol. 194, 757-762.

18 Matthjis, H.C.P., van der Staay, G.W.M., van Amerongen, H., van Grondelle, R. és Garab, G. (1989) Biochim. Biophys. Acta 975, 185-187.

19 Thornber, J.P. (1975) Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 127-158.

20 Kühlbrandt, W., Wang, D.N. és Fujiyoshi, Y. (1994) Nature 367, 614-621.

21 Nussberger, S., Dorr, K., Wang, D.N. és Kühlbrandt, W. (1993) J. Mol. Biol. 234, 347-356.

22 Butler, P.J.G. és Kühlbrandt, W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3797-3801.

23 Larsson, U.K. és Andersson, B. (1985) Biochim. Biophys. Acta 809, 369-402.

24 Jansson, S. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1184, 1-19.

25 Pichersky, E., Subramaniam, R., White, M.J., Reid, J., Aebersold, R. és Green, B.R. (1991) Mol. Gen. Genet. 227, 277-284.

26 White, M.J. és Green, B.R. (1987) Eur. J. Biochem. 165, 531-535.

27 Bassi, R., Rigoni, F. és Giacometti, G.M. (1990) Photochem. Photobiol. 52, 1187-1206.

28 Clark, S.E., Abad, M.S. és Lamppa, G.K. (1989) J. Biol. Chem. 264, 17544-17550.

29 Plumley, F.G. és Schmidt, G.W. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 841, 146-150.

30 Mullett, J.E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 9941-9948.

31 Garab, G., Faludi-Dániel, A., Sutherland, J.C. és Hind, G. (1988) Biochemistry 27, 2425-2430.

32 Breton, J. és Vermeglio, A. (1982) Photosynthesis (Govindjee, szerk.), pp. 153-193, Academic Press, New York.

33 Joliot, P., Bennoun, P. és Joliot, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 317-328.

34 Garab, G., Finzi, L. és Bustamante, C. (1991) Light in Biology and Medicine (Douglas, R.H., Moan, J. és Rontó, G., szerk.), pp. 77-88, Plenum Press, New York, London.

35 Garab, G., Wells, K.S., Finzi, L. és Bustamante, C. (1988) Biochemistry 27, 5839-5843.

36 Barzda, V., Mustárdy, L. és Garab, G. (1994) Biochemistry 33, 10837-10841.

37 Powles, S.B. (1984) Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 15-44.

38 Prasil, O., Adir, N. és Ohad, I. (1992) The Photosystems, Topics in Photosynthesis (Barber, J., szerk.), pp. 220-250,

39 Horton, P., Ruban, A.V., Rees, D., Pascal, A.A., Noctor, G. és Young, A.J. (1991) FEBS Lett. 292 (1,2), 1-4.

40 Gilmore, A.M., Hazlett, T.L. és Govindjee (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2273-2277.

41 Thompson, L.K. és Brudwig, G.W. (1988) Biochemistry 27, 6653-6658.

42 Telfer, A., De Las Rivas, J. és Barber, J. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1060, 106-114.

43 Bennett, J., Steinback, K.E. és Arntzen, C.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5253-5257.

44 Allen, J.F. (1995) Physiol. Plant. 93, 196-205.

45 Anderson, J.M. és Andersson, B. (1988) Trends in Biol. Sci. 13, 351-355.

46 Larsson, U.K., Sundby, C. és Andersson, B. (1987) Biochim. Biophys. Acta 894, 59-68.

47 Bonaventura, C. és Myers, J. (1969) Biochim. Biophys. Acta 189, 366-389.

48 Murata, N. (1969) Biochim. Biophys. Acta 172, 242-251.

49 Nagy, F., Kay, S.A. és Chua, N.H. (1988) Genes and Development 2, 376-382.

50 Paulsen, H. és Bogorad, L. (1988) Plant Physiol. 88, 1104-1109.

51 Giuliano, G., Hoffmann, N.E., Ko, K., Scolnik, P.A. és Cashmore, A.R. (1988) The EMBO Journal 7, 3635-3642.

52 Stayton, M.M., Brosio, P. és Dunsmuir, P. (1989) Plant Physiol. 89, 776-782.

53 Millar, A.J. és Kay, S.A. (1991) The Plant Cell J. 3, 541-550.

54 Taylor, W.C. (1989) Ann. Rev. Plant Physiol. 40, 211-233.

55 Ranjeva, R. és Bondet, A.M. (1987) Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 73-93.

56 Bhalla, P. és Bennett, J. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252, 249-254.

57 Bennett, J. (1977) Nature 269, 344-346.

58 Foyer, C. (1985) Biochem. J. 231, 97-103.

59 Guitton, C., Dorne, A-M. és Mache, R. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. 121, 297-303.

60 Soll, J. és Buchanan, B.B. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6686-6689.

61 Soll, J. és Bennett, J. (1988) Eur. J. Biochem. 175, 301-307.

62 Bennett, J. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 133-137.

63 Bennett, J. (1979) FEBS Lett. 103, 342-344.

64 Steinback, K.E., Bose, S. és Kyle, D.J. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 216, 356-361.

65 Black, M.T. és Horton, P. (1985) Biochem. Biophys. 767, 568-573.

66 Bennett, J. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 85-89.

67 Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. és Bennett, J. (1988) J. Biol. Chem. 263, 1123-1130.

68 Hodges, M., Migniac-Maslow, M., le Marchal, P. és Remy, R. (1990) Current Research in Photosynthesis (Baltscheffsky, M., szerk.), pp. 875-878, Kluwer, Dordrecht.

69 Guitton, C. és Mache, R. (1987) Eur. J. Biochem. 166, 249-254.

70 Myuto, S. és Shimogawara, K. (1985) FEBS Lett. 193, 88-92.

71 Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Haley, B.E., Hanson, K.R. és McHale, N.A. (1990) Plant Physiol. 93, 105-109.

72 Clark, R.D., Hind, G. és Bennett, J. (1985) Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus (Steinback, K., Bonitz, S., Arntzen, C.J. és Bogorad, L., szerk.), pp. 259-267, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

73 Lucero, H.A., Cortez, N. és Vallejos, R.H. (1987) Biochim. Biophys. Acta 890, 77-81.

74 Bennett, J., Shaw, E.K. és Bakr, S. (1987) FEBS Lett. 210, 22-26.

75 Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E. és Arntzen, C.J. (1981) Nature 291, 25-29.

76 Silverstein, T., Cheng, L. és Allen, J.F. (1993) FEBS Lett. 334, 101-105.

77 Gal, A., Shahak, Y., Schuster, G. és Ohad, I. (1987) FEBS Lett. 221, 205-210.

78 Gal, A., Schuster, G., Frid, D., Canaani, O., Schweiger, H.-G. és Ohad, I. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7785-7791.

79 Lemaire, C., Girard-Bascon, J. és Wollmann, F-A. (1987) Progress in Photosynthesis Research (Biggins, J., szerk.), pp. 655-658, Martinus Nijhoff, Dordrecht.

80 Bennett, J., Shaw, E.K. és Michel, H. (1988) Eur. J. Biochem. 171, 95-100.

81 Arnon, D.J. (1949) Plant Physiol. 24, 1-15.

82 Nagy, F., Kay, S.A. és Chua, N.H. (1987) Plant Gene Research Manual (Gelvin, S.B. és Schilperoorf, R.A., szerk.), pp. 1-29, Kluwer Academic Press, Dordrecht.

83 Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

84 Anderson, J.M., Waldron, J.C. és Thorne, S.W. (1987) FEBS Lett. 92, 227-233.

85 Faludi-Dániel, A. és Mustárdy, L. (1983) Plant Physiol. 73, 16-19.

86 Bennett, J. (1991) Ann. Rev. Plant Physiol. 42, 281-311.

87 Oettmeyer, W., Godde, D., Kunze, B. és Hofle, G. (1985) Biochim. Biophys. Acta 807, 216-219.

88 Jones, R.W. és Whitmarsh, J. (1988) Biochim. Biophys. Acta 933, 258-268.

89 Selak, M.A. és Whitmarsh, J. (1982) FEBS Lett. 150, 286-292.

90 Rich, P.R., Magdwick, S.A., Brown, S., Jagow, G. és Brandt, U. (1992) Photosynth. Res. 34, 465-477.

91 Lamppa, G., Morelli, G. és Chua, N.H. (1985) Mol. Cel. Biol. 5, 1370-1378.

92 Adamska, I., Scheel, B. és Kloppstech, K. (1991) Plant Mol. Biol. 17, 1055-1065.

93 Garab, G., Szitó, T. és Faludi-Dániel, A. (1987) Light Reactions (Barber, J., szerk.), pp. 305-339, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

94 Finzi, L., Bustamante, C., Garab, G. és Juang, C-B. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8748-8752.

95 Garab, G., Leegood, R.C., Walker, D.A., Sutherland, J.C. és Hind, G. (1988) Biochemistry 27, 2430-2434.

96 Keller, D. és Bustamante, C. (1986) J. Chem. Phys. 84, 2961-2971.

97 Webber, A., Baker, N., Platt-Aloia, K. és Thomson, W. (1984) Physiol. Plant. 60d, 171-179.

98 Barber, J. (1987) The Biochemistry of Plants (Hatch, M.D. és Boardman, N.K., szerk.), pp. 57-130, Academic Press, London.

99 Bennett, J. (1984) Physiol. Plant. 60, 583-590.

100 Piechulla, B. (1993) Plant Mol. Biol. 22, 533-542.

101 Henessey, T.L. és Field, C.B. (1991) Plant Physiol. 96, 831-836.

102 Allen, J.F. (1993) Photosynth. Res. 36, 95-102.

103 Oettmeyer, W., Masson, K. és Dostatni, R. (1987) Biochim. Biophys. Acta 890, 260-269.

104 Clark, R.D. és Hind, G. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6249-6253.

105 Bennett, J., Shaw, E.K. és Michel, H. (1988) Eur. J. Biochem. 171, 95-100.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok dr. Dudits Dénesnek, amiért a dolgozatban leírt munkát a vezetése alatt álló intézetben elvégezhettem. Köszönöm dr. Garab Győzőnek, csoportvezetőmnek a magas szintű szakmai segítséget, iránymutatást. Köszönöm Jávorfi Tamásnak az ábrák kivitelezésében nyújtott segítségét. Köszönetet mondok csoportunk minden tagjának a munkámhoz nyújtott segítségért és tanácsaikért. Végül köszönöm mindazok segítségét, akik a dolgozat kivitelezésében segítettek.