

DOKTORI ÉRTEKEZÉS**A FOTOSZINTETIKUS ELEKTRONTRANSPORT LÉGZÉSKONTROLLJA
MAGASABB RENDŰ NÖVÉNYEKBEN**

Írta:

LAJKÓ FERENC

Témavezető:

Dr. GARAB GYŐZŐ

MTA Szegedi Biológiai Központ
Növényélettani Intézete
Szeged
1991

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
2.1. A fotoszintézis evolúciójának alapjai	4
2.2. A légzés és a fotoszintézis kapcsolata	8
2.2.1. Fotoszintetikus prokarióták	9
2.2.2. Fotoszintetikus eukarióták	14
2.3. Klororespiráció	15
3. CÉLKITŰZÉS	18
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
4.1. Növényi anyag	19
4.2. Preparatív eljárások	
4.2.1. Protoplasztisz	20
4.2.2. Intakt kloroplasztisz	21
4.2.3. Tilakoid membrán	23
4.2.4. Kloroplasztisz határhártya és a sztróma folyadék	23
4.2.5. Kloroplasztisz határhártya	23
4.3. Műszeres mérőmódszerek	
4.3.1. A klorofill tartalom meghatározása	24
4.3.2. Az elektrokróm abszorpcióváltozás mérése	25
4.3.3. Fluoreszcencia indukció mérése	26
4.3.4. Az oxigénfejlesztő képesség mérése	28
4.3.5. Az elektrontranszport sebességének mérése	28

4.3.6. A SOD aktivitásának mérése	29
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	
5.1. A klororespiráció kimutatása magasabb rendű növényekben	30
5.1.1. Protoplasztiszok, levelek	31
5.1.2. Izolált kloroplasztisz, tilakoid membrán	34
5.2. A klororespiráció és a fotoszintézis versengése	37
5.3. A cianid hatóhelyeinek elkülönítése	42
5.4. A magasabb rendű növények összehasonlítása cianobaktériumokkal és egysejtű algákkal	45
5.4.1. Klororespiráció egysejtű algákban	45
5.4.2. A légzés és a fotoszintézis kölcsönhatása cianobaktériumokban	48
5.5. A klororespiráció terminális oxidázának spektroszkópiai azonosítása	51
5.6. A klororespiráció fiziológiai szerepe	53
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	59
7. ÖSSZEFOGLALÁS	71
IDÉZETT IRODALOM	72
FÜGGELÉK	78

Rövidítések jegyzéke

ΔA_{515}	: villanófény-indukált elektrokróm abszorpcióváltozás 515 nm-nél
BSA	: bovin-szérumalbumin
CCCP	: karbonilcianid-m-klorofenilhidrazon
DBMIB	: 2,5-dibromo-3-metil-6-izopropil-p-benzokinon
DCCD	: N,N-diciklohexilkarbodiimid
DCMU	: 3-(3,4-diklórfenil)-1,1-dimetilurea
FNR	: ferredoxin:NADP-oxidoreduktáz (EC. 1.18.1.2.)
Kl <u>a</u> , Kl <u>b</u>	: klorofill a, klorofill b
MOPS	: 3-(N-morfolin)propánszulfonsav
PEG	: polietilénglikol
PMS	: N-metil-fenazin-metaszulfát
PMSF	: fenilmetilszulfonil-fluorid
PSI, PSII	: első, második fotokémiai rendszer
Q _A és Q _B	: a második fotokémiai rendszer kinon akceptorai
SHAM	: szalicilhidroxilamid-sav
SOD	: szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1.)
Tris	: trisz-(hidroximetil)-amino-metán

1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis az a folyamat, melynek során a magasabb rendű növények, algák és a fotoszintetikus baktériumok a fényenergiát metabolikus energiává alakítják át. A fotoszintézis ily módon a napfény sugárzási energiájának kémiai energiává történő átalakításával biztosítja a földi élethez szükséges energiát illetve táplálékot. A cianobaktériumoknak és a zöld növényeknek köszönhető a magasabb rendű élet fenntartásához nélkülözhetetlen oxigén is.

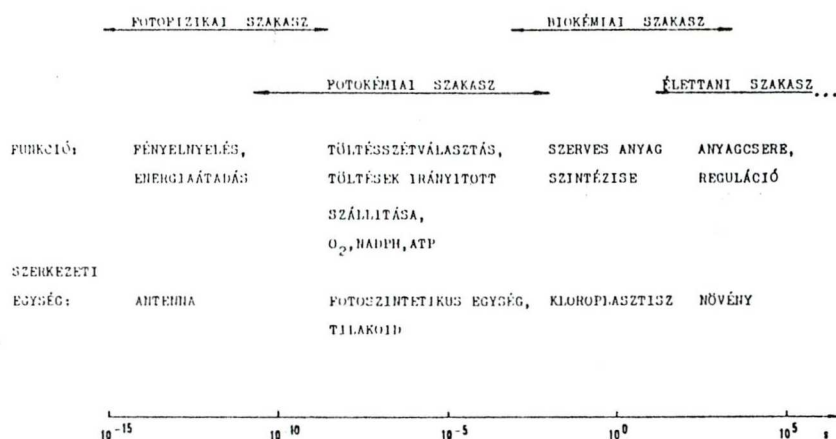
A zöld növények szolgáltatják valamennyi magasabb rendű élőlény anyag- és energiacseréjének fenntartásához, és nem utolsósorban a gyors ütemben növekvő emberi népesség táplálkozásához alapul szolgáló szerves vegyületeket.

A fotoszintézis kutatás nemcsak az alapvető jelentőségű biológiai folyamat megismerésére irányul, hanem állandóan szem előtt kell hogy tartsa a gyakorlati alkalmazhatóság követelményét is, például a növénynemesítésben és növényvédelemben, a környezetvédelemben és az alternatív energiaforrások területén.

A fotoszintetikus fényenergiahasznosítás bonyolult reakciók szorosan egymáshoz kapcsolt sorozata, amelynek lépései a végbemenő részfolyamatok természete, helye és időbeli lefutása alapján elkülöníthetők (1).

A fényenergia elnyelődése a fotofizikai szakasz során az antennapigmentekben

történik. Az elnyelt fényenergia energiaátadási folyamatok révén a reakciócentrumokra jut, ahol az elsődleges töltésszétválasztás történik. Az ezt követő redox folyamatok, és a töltések irányított szállítása eredményeként szabadul fel a molekuláris oxigén és a redukáló erőt hordozó NADPH.



1. ábra A fotoszintézis folyamatainak időskálája Kamen nyomán (1).

A töltésszétválasztás során a tilakoid membrán külső és belső oldala között kialakul egy elektromos potenciálkülönbség, és az elektrontranszportot kísérő proton felvétel ill. leadás miatt egy pH-grádiens, amelyek az ATP szintézis során hasznosulnak (2). Az ATP molekulában kémiai tárolt energiát és a NADPH redukáló erejét felhasználva játszódnak le a szerves anyagok szintézisének lépései.

A fotoszintetizáló sejtekben a fotoszintézis redox folyamataival ellentétes irányú

reakciósorozatok is folyhatnak: a légzés során általában NADPH-tól az oxigén felé irányuló elektrontranszport révén ATP termelődik. Prokariótákban ez a két ellentétes irányú, de azonos kompartmentumban lejátszódó folyamat szoros kölcsönhatásban áll egymással.

Néhány éve zöld algák kloroplasztiszaiban légzési funkcióra utaló jeleket találtak; ezt a légzési folyamatot klororespirációnak nevezték el (62).

Dolgozatomban a magasabb rendű növények kloroplasztiszainak légzésfolyamataival ill. annak a fotoszintézisre gyakorolt hatásával kívánok foglalkozni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az élet a Földön mintegy 3,8 milliárd éves (3). Az első fotoszintetizáló prokarióták kb. 3,5 milliárd éve jelentek meg egy primitív földi atmoszférában, erősen redukáló környezetben (4). Ezekben az organizmusokban már a porfirin szerkezetű vegyületek megtalálhatók voltak.

Mintegy 2 milliárd évvel ezelőtt az oxigén koncentrációja jelentős mértékben megnövekedett az atmoszférában (5). Ez válságot jelentett az olyan sejteknek, amelyek nem rendelkeztek hatékony oxigénhasznosító rendszerrel. Az oxigén koncentrációjának növekedésével fokozatosan csökkent az abiotikusan termelődő metabolitok mennyisége, így az élet a Földön közvetve vagy közvetlenül fotoszintézis függővé vált (6). A magasabb rendű földi élet folyamatosan megújuló energia szükségletét egyedül a fotoszintézis biztosítja, ugyanakkor ezen szervezetek oxigénigényét is, mintegy melléktermékként, szintén a fotoszintézis szolgáltatja.

2.1. A fotoszintézis evolúciójának alapjai

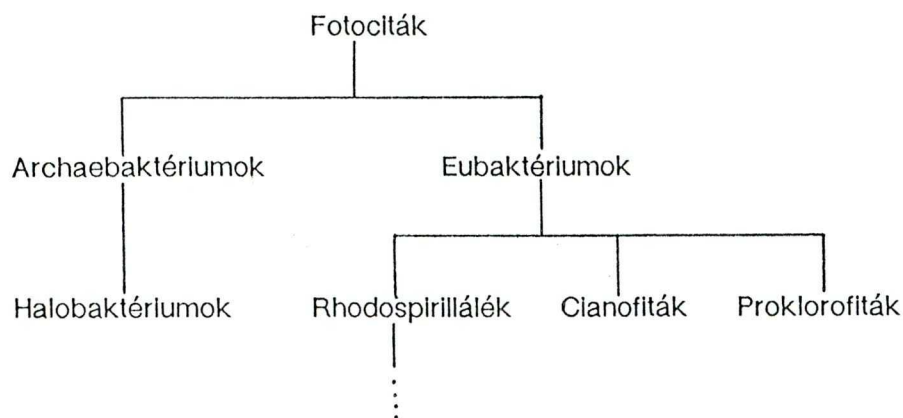
A fotoszintetikus baktériumokat korábban két csoportra osztották (2a. ábra). Az egyik csoport az archaebaktériumok csoportja (ide soroljuk a halobaktériumokat is) (7),

az összes többi fotoszintetikus baktériumot pedig az eubaktériumokhoz sorolták (8). Az archaeobaktériumok és az eubaktériumok fotoszintézisének módja teljesen eltér egymástól. A fotoszintézis szempontjából a fő különbség az eubaktériumok és az archaeobaktériumok között az a mód, ahogyan az ADP foszforilációjához szükséges elektrokémiai gradienst előállítják. Az eubaktériumokban központi szerepe van a klorofill-függő töltésszétválasztásnak a fotoszintetikus membrán reakciócentrumaiban, amely egy elektrokémiai protongradienst hoz létre a membránon keresztül (9). Az archaeobaktériumokhoz sorolt halobaktériumokban az elektrokémiai protongradiens létrehozásában egyetlen, a bífórmembránban elhelyezkedő, hexagonális rácstruktúrába szerveződött fehérje, a bakteriorodopszin vesz részt (10,11).

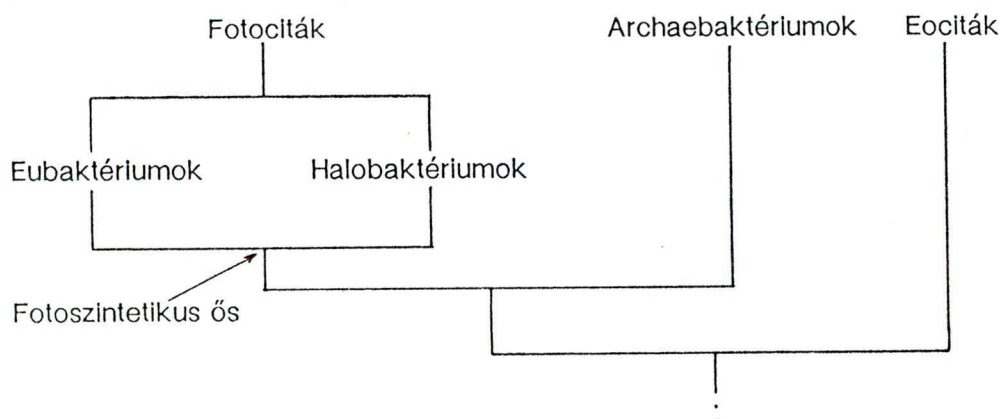
E szerint a csoportosítás szerint úgy tűnhet, hogy a fotoszintézist a természet kétszer "találta fel": egyszer az archaeobaktériumok, egyszer az eubaktériumok formájában.

Egyes kutatók szerint a halobaktériumok és az összes eubaktérium, beleértve a nem fotoszintetikus eubaktériumokat is, valószínűleg egyazon fotoszintetikus őstől származnak, melyet fotocitáknak neveznek (12-14). Lake és munkatársai ezen elmélet szerint kiemelik a halobaktériumokat az archaeobaktériumok csoportjából és rendszertanilag egy kombinált fotoszintetikus csoport létrehozását tartják helyesnek (2b. ábra). Bizonyítékként a riboszóma háromdimenziós struktúrájának hasonlóságát hozzák fel. Ezen vizsgálatok alapján a halobaktériumok sokkal nagyobb hasonlóságot mutatnak az eubaktériumokhoz, mint más archaeobaktériumokhoz.

(a)



(b)



2. ábra A fotoszintetikus prokarióták filogenetikus osztályozása (a) Woese és Fox, (b) Lake nyomán. Magyarázatát lásd a szövegben.

A fejlődés a következő lépésben három irányban indult meg. Az eubaktériumokból és a halobaktériumokból kialakultak a bíborbaktériumok, a cianobaktériumok és a proklorofiták. A bíborbaktériumok már tartalmaznak bakterioklorofillt és karotinoidokat (15), de nem képesek a vizet oxidálni, azaz oxigént fejleszteni. A cianobaktériumok, régebbi elnevezésük szerint kékmoszatok,

rendelkeznek oxigénfejlesztő rendszerrel és az elektrontranszport láncuk is nagymértékben hasonlít a magasabb rendűekéhez. A magasabb rendűekkel ellentétben a K1 b helyett azonban fikobiliszómát tartalmaznak. A proklorofitákban már megtalálható a K1 a és b és képesek oxigén fejlesztésre is (16). Mind a proklorofitákban mind a cianobaktériumokban a légzés és a fotoszintézis azonos kompartmentumban helyezkedik el, ellentétben az eukariótákkal ahol a sejtmag megjelenése mellett kialakulnak a határhártyával burkolt sejtszervecskék is.

Az eukarióták kialakulását magyarázó elméletek között két egymással szemben álló hipotézist találunk. Az egyik az endoszimbiózis elmélet. E szerint mind a nukleáris, mind az organelláris génvonal hosszú időn át, egymástól függetlenül létező sejtekben fejlődött. A két génvonal egyesülésének eredménye az eukarióta sejt kialakulása (17).

Ezzel ellentétben az autogén eredet hipotézis azt feltételezi, hogy egyetlen sejten belül fejlődött a nukleáris és organelláris génvonal vagyis ez az elmélet az eukarióta sejtek kialakulását egyetlen organizmus fejlődésének tekinti. Ennek az elméletnek több variációja létezik, úgy mint a "Cluster-clone" (18), és a plazmid hipotézisek (19,20), továbbá Keyhoni (21.), Reijnders (22), Uzzel és Spolsky (23) és Woese (24) nevével fémjelzett hipotézisek.

Abban mind az autogén, mind az endoszimbiózis elmélet megegyezik, hogy a nukleáris és organelláris gének közös őstől származnak. Ma az endoszimbióta elmélet

az elterjedtebb, de nincsenek döntő bizonyítékok sem pro, sem kontra.

A kloroplasztisz kialakulásának útja sem tisztázott. Cavalier-Smith (25) szerint a kloroplasztisz "single" eredetű, azaz egyetlen őstől származik. Ezzel szemben Raven (26) "multiple" eredetűnek, azaz több őstől származónak tekinti. A bíbor baktériumok és a zöld baktériumok reakciócentrumai nagymértékben hasonlítanak a kloroplasztiszok egyes és kettős reakciócentrumaihoz (27). Dr. Horváth Gábor hipotézise szerint ez úgy képzelhető el, hogy a kloroplasztiszok a bíbor és a zöld baktériumok fúziójából keletkeztek.

2.2. A légzés és a fotoszintézis kapcsolata

Az élő sejtekben a légzés és a fotoszintézis az a két fő bioenergetikai folyamat, amely a növekedéshez és a reprodukcióhoz nélkülözhetetlen energiát szolgáltatja. Mindkét energiaátalakító rendszer együttesen van jelen a fotoszintetikus organizmusok túlnyomó többségében (bíbor baktériumok, cianobaktériumok, algák és magasabb rendű növények). A légzés folyamán a redukált komponensek molekuláris oxigén által történő oxidációjából felszabaduló szabadenergia rovására folyik az ATP-szintézis. A fényenergia konverziója a fotoszintézis során, oxigén felszabadulás mellett, szintén energiában gazdag ATP-t termel. Mindkét folyamat működéséhez különböző elektronátvivő komponensek szükségesek, amelyek egy zárt vezikulumot alkotó

membránban helyezkednek el.

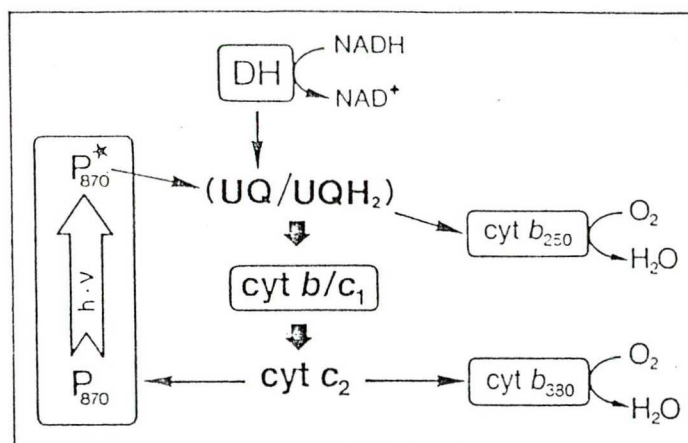
2.2.1. Fotoszintetikus prokarióták

A fotoszintetikus prokarióták csoportja nagyon változatos. Közülük több bíbor, nem-kén baktériumról (*Rhodospirillum rubrum*, *R. capsulatus*, *R. sphaeroides*) bebizonyították, hogy képes a terminális oxidázával az oxigén redukciójára. Zöld baktériumok hasonló viselkedésére nincsenek adatok az irodalomban.

Bíborbaktériumok. A légzési elektrontranszport útja nagyon változatos lehet a környezeti tényezőktől függően. Általában két terminális oxidáz szintetizálódik. Leggyakrabban egy b-típusú citokróm, de néha előfordulhat az aa₃-típus is. A leggyakoribb légzési elektrontranszport út magába foglalja a kinont, a citokróm b/c komplexet és egy hidrofil citokróm c₂-t. A fotoszintetikus elektrontranszport P870-et hordozó komplexet, ubikinont, citokróm b/c komplexet és citokróm c₂-t tartalmaz (28).

A fotoszintetikus bíborbaktériumok esetén a két elektrontranszport lánc között a kölcsönhatás régóta ismert. Van Niel (29) és Nakamura (30) folyamatos megvilágítás során kimutatták a légzés teljes, reverzibilis gátlását. A fényindukált gátlás szétkapcsolók (pl. CCCP) hozzáadásával megszüntethető. Ezen jelenség magyarázatára két mechanizmus képzelhető el. Az első szerint a fényindukált membránpotenciál termodinamikusan kontrollt gyakorol a légzési láncra (31,32). Az

ilyen típusú gátlás folyamatos megvilágítás esetén figyelhető meg. A második magyarázat szerint a kölcsönhatás a közös elektronhordozók redox állapotának fényindukált megváltozásában keresendő (33). A legszélesebb körben elfogadott modell szerint a légzési és a fotoszintetikus elektrontranszport lánc az ubikinon molekuláknál ágazik ketté (3. ábra) (34). Az ubikinon molekulákat redukálhatja a fotoszintézis és a dehidrogenáz enzim is. A redukált ubikinon molekulákból az elektronok kétfelé ágazhatnak el. Vagy a légzési lánc terminális oxidáza felé, vagy a fotoszintetikus lánc citokróm b/c komplexe felé. A következő elágazási pont a citokróm c_2 körül található.



3. ábra A légzési és fotoszintetikus elektrontranszport funkcionális kölcsönhatása, bíbor, nem-kén *Rhodospirillum rubrum* baktériumokban. A vastaggal szedett redox komponensek a légzés és a fotoszintézis közös alkotói. P870, reakció centrum; DH, dehidrogenáz; UQ/UQH₂ oxidált és redukált ubikinon; cyt, citokróm. Az ábra Venturoli nyomán készült (34).

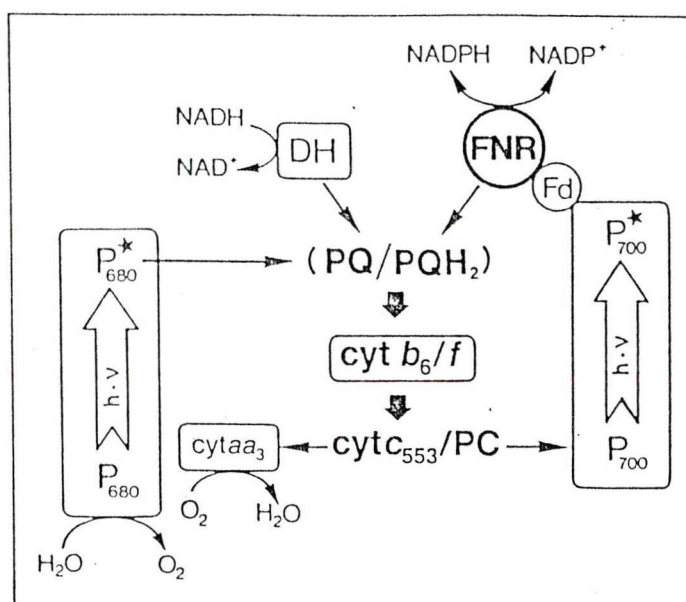
Cianobaktériumok. A kékoszatok fotoszintetikus elektrontranszport lánc rendelkezik PSI-gyel és PSII-vel, hasonlóan a magasabb rendűekhez, továbbá

plasztokinon molekulákkal és citokróm b_6/f komplexszel, amely homológ a mitokondrium b/c komplexével, és egy oldható citokróm c_{553} -al. A citokróm c_{553} -at néhány cianobaktériumban egy réztartalmú protein, a plasztocianin helyettesítheti. (Magasabb rendűekben csak plasztocianint találunk.)

A légzési és fotoszintetikus elektrontranszport lánc kölcsönhatását számos tanulmány bizonyítja (35,36). A fotoszintetikus elektrontranszport az intracitoplazmás (tilakoid) membránban található. A légzési elektrontranszport helye vitatott, egyes szerzők szerint minden komponens a tilakoid membránban helyezkedik el, más szerzők szerint a terminális oxidáz a sejtet határoló membránban található (37,38). A tilakoidból kétféle kinont izoláltak, a plasztokinont és a fillokinont. A legtöbb szerző a plasztokinont (és nem a fillokinont) tartja a légzési lánc tagjának (35). A két elektrontranszport elágazását a plasztokinon molekulák körül valószínűsítik. Gátlószerekkel végzett kísérletek azonban arra utalnak, hogy a plasztokinon molekulán kívül a citokróm b_6/f komplex és a citokróm c_{553} is kettős funkcióval rendelkezik (38-41). A légzési és fotoszintetikus elektrontranszport feltételezett kölcsönhatását a 4. ábrán mutatom be.

Cianobaktériumokban a redukáló komponenseket nagyrészt a NADH és a NADPH szolgáltatja a légzési elektrontranszport láncnak. (Találtak azonban a szukcinát dehidrogenáz jelenlétére utaló jeleket is (42).) A NADH-t és a NADPH-t két különböző dehidrogenáz oxidálja. A NADH dehidrogenázt sikerült izolálni, de a

NADPH membránkötött dehidrogenázát nem találták még meg a tilakoid membránban. Scherer és mtsi. kimutatták (43), hogy a NADPH oxidációja sötétben a légzési elektrontranszport eredménye és a ferredoxin:NADP-oxidoreduktáz (FNR) közreműködésével történik. Az FNR a fotoszintetikus elektrontranszport lánc komponense, fényben a PSI elektronakceptoraként gondoskodik a NADPH termeléséről.



4. ábra A légzési és a fotoszintetikus elektrontranszport funkcionális kölcsönhatása *Anabaena variabilis* cianobaktériumokban. A vastaggal szedett redox komponensek a légzés és a fotoszintézis közös alkotói. P680, első fotoszintetikus reakciócentrum; P700, második fotoszintetikus reakciócentrum; PQ/PQH₂, oxidált és redukált plasztokinon; cyt., citokróm; PC, plasztocianin; DH, dehidrogenáz; Fd, ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz. Az ábra Scherer nyomán készült (35).

A légzési elektrontranszport fényregulációja vegetatív sejtekben két úton mehet végbe (lásd 4. ábra) (35):

1. A NADPH oxidációja csökken, hiszen fényben az FNR reduktáz aktivitása a domináns. Ismeretes, hogy kloroplasztiszból az FNR aktivitását fény hatására fellépő konformáció-változások is regulálhatják. Hasonló mechanizmus biztosíthatja cianobaktériumokban a dehidrogenáz aktivitást is.

2. A szabályozás másik típusa a PSI versengése a terminális oxidázzal. A citokróm c_{553} közös elektrondonora a PSI-nek és a terminális oxidáznak. A kompetíciót a molekuláris oxigén szabályozhatja (38). Ezt a fajta kompetíciót a légzés és a fotoszintézis között megtalálhatjuk az izolált heterociszták esetében is (44).

Összegzésként elmondhatjuk, hogy a legtöbb fotoszintetikus prokariótában egyetlen kompartmentumban, sőt legtöbb esetben ugyanazon membránban találhatjuk, mind a fotoszintetikus, mind a légzési elektrontranszport láncot. Ez a két, egymással ellentétes (reduktív és oxidatív) elektrontranszport a fotoszintetikus baktériumok esetén az intracitoplazmatikus membránban (45), cianobaktériumok esetén a tilakoid membránban helyezkedik el. Néhány elektronhordozó közös a két láncban (kinonok, citokróm b/c komplex, oldható citokrómok) (46). A fotoszintézis és a légzés, ezen organizmusokban "finomhangolt" regulációval kapcsolódik egymáshoz.

2.2.2. Fotoszintetikus eukarióták

A légzés és a fotoszintézis sokkal ősbibb típusú kölcsönhatásának megmaradása mellett szólnak azok az adatok, melyek zöld algák kloroplasztiszaiban egy légzési lánc működésére utaltak.

Az eukarióta növényeket prokariótákkal összehasonlítva energetikai szempontból a legfontosabb különbség az, hogy a légzés és a fotoszintézis önálló, határhártyával körülvett sejtszervecskébe különült el. A légzés helye a mitokondrium, a fotoszintézisé a kloroplasztisz. A két funkció tehát térben elkülönült. Így megszűnt a légzés és a fotoszintézis szoros, egyetlen kompartmentumon belüli kölcsönhatásának feltétele.

Az egyértelmű, hogy a mitokondriumnak nincs fotoszintetikus funkciója. A kloroplasztiszban azonban találhatunk oxigénnel való kölcsönhatást (pl. Mehler-reakció). Ismeretes, hogy a kloroplasztisz és a mitokondrium komplex kölcsönhatásban áll egymással. A mitokondriális légzés (mitorespiráció) fénnel gátolható. A kloroplasztiszban a fény hatására fellépő oxidációs folyamatok a Calvin-ciklus karboxilációs reakcióit leállítják a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz/oxidáz enzim regulálásával (fotorespiráció).

Az elmúlt évtizedben zöld algák kloroplasztiszaiban egy új légzésfajta fedeztek fel, melyet Bennoun klororespirációnak nevezett el.

Dolgozatom témája a magasabb rendű növények klororespirációja, ezért a klororespiráció témakörében elért eredményekkel egy külön fejezetben kívánok foglalkozni.

2.3. Klororespiráció

Mikroalgákon végzett korai megfigyelések megmutatták, hogy fényen, anaerob körülmények között képesek hidrogén fejlesztésre (47), és ez a hidrogénfejlődés DCMU-val nem gátolható. Ebből következik, hogy a hidrogénfejlődés nem származhat a víz bontásából (48). Feltételezhető, hogy a hidrogén a szénhidrát lebontása során keletkezik a citromsav és a glioxalát cikluson keresztül (49-52). A hidrogén fény hatására történő fejlődése érzékeny a plasztokinon antagonistá DBMIB-re, ami azt bizonyítja, hogy a kloroplasztisz plasztokinonja központi szerepet játszik ebben az oxidoredukciós folyamatban (53).

Diner és Mauzerall kísérleteiben kimutatta, hogy a plasztokinon molekulák redukáltsági állapotát nem csak a fotoszintetikus elektrontranszport képes megváltoztatni, hanem sötétben is redukálódik (54).

NADH és a szukcinát dehidrogenázok jelenlétére a kloroplasztiszban több adat is utal. Sejtmentes kivonatokban a NADH donorként szerepel a fotoszintetikus elektrontranszportban a hidrogén fejlődéshez (55). Godde és Trebst (56) kimutatta,

hogy a *Chlamydomonas reinhardtii*-ből kivont kloroplasztisz frakció képes a NADH-t oxidálni. Ez a reakció érzékeny rotenonra, DBMIB-re és DCCD-re. Ez egy NADH-dehidrogenáz jelenlétére utal a fotoszintetikus elektrontranszport plasztokinon molekulájának redukciós oldalán.

Peltier és Thibaut (57) gyenge oxigén fejlődést figyelt meg PSI-hiányos mutánsban és ez az oxigénfejlődés gátolható volt CCCP-vel és rotenonnal. Ebből arra lehet következtetni, hogy a víz oxidációja a NADPH redukciójához vezet egy NADPH-plasztokinon-oxidoreduktázon keresztül, felhasználva a fényindukált membránpotenciált. A NADH-oxidoreduktáz reverzibilitását fotoszintetikus baktériumokban is megfigyelték (58).

Nemrégiben kimutatták, hogy a szukcinát-dehidrogenáz aktivitásának mintegy 25 %-a a kloroplasztiszban van (59), ellentétben azzal a korábbi feltételezéssel, hogy szukcinát-dehidrogenáz aktivitás csak a mitokondriumban található.

A NADH-dehidrogenáz jelenlétét a kloroplasztiszban genetikai adatok is alátámasztják. *Nicotiana tabacum* és *Marchantia polymorpha* kloroplasztisz genomjának teljes nukleotid szekvencia analízise rendelkezésre áll (60). Az analízis azzal a meglepő eredménnyel szolgált, hogy mindkét vizsgált kloroplasztisz tartalmaz 7 *ndh* gént, ami homológiát mutat a mitokondriális légzés NADH-dehidrogenázának 7 alegységével. Az is ismert, hogy a mitokondriális NADH-dehidrogenáz 49 kDa-os alegységének létezik kloroplasztiszban kódolt homológja (61). Hat *ndh* gén jelenléte

számos kloroplasztisz genomjában igazolt (cukorrépa, lóbab és rizs).

A kloroplasztiszban jelenlévő oxidázról nagyon kevés információval rendelkezünk, csak közvetett bizonyítékaink vannak. Bennoun (62) tapasztalata szerint ha különböző oxidáz gátlókat (CO, NO, KCN) adunk egysejtű algákhoz, a kloroplasztisz plasztokinon molekulájának redukáltsági állapota nagy mértékben megnő. Ez a kísérlet volt az első, amely bizonyította egy plasztokinontól az oxigén felé történő elektrontranszport jelenlétét a kloroplasztisz tilakoid membránjában. Ezt a "légzésszerű" elektrontranszportot nevezte el Bennoun klororespirációnak. Bennoun kísérletei nyomán, az azóta eltelt időben a klororespiráció meglétét már *Mantoniella* és *Phaeodactylus* algákon is sikerült bizonyítani (63).

3. CÉLKITŰZÉS

A légzés és a fotoszintézis kölcsönhatásának kutatása már régóta folyik. Közel 10 éve ismeretes, hogy az egysejtű algák kloroplasztiszaik légzési tevékenységet folytatnak. A klororespirációnak elnevezett jelenségről még nagyon keveset tudunk, nem ismerjük a légzési és fotoszintetikus elektrontranszport lánc elágazásának pontos helyét, a légzési lánc komponenseit, a terminális oxidázt, és a klororespiráció fiziológiai szerepét sem. Munkánk megkezdéséig az irodalomban nem voltak adatok a magasabb rendű növények klororespirációs tevékenységét illetően.

Ezért célul tűztük ki,

- a klororespiráció kimutatását magasabb rendű növényekben;
- a magasabb rendű növényeken végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítását cianobaktériumokban és zöld algákban már ismert adatokkal és az általunk kapott eredményekkel;
- a légzési és a fotoszintetikus elektrontranszport lánc elágazási helyének azonosítását;
- a kloroplasztiszban lévő légzési lánc terminális oxidázának spektroszkópiai kimutatását;
- a különböző környezeti tényezők hatásának vizsgálatát a zöld algák és a magasabb rendű növények klororespirációs aktivitására.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növényi anyag

A *Synechococcus* sp. PCC 6301 cianobaktériumot 40 W/m^2 intenzitású állandó fényen neveltük, szobahőmérsékleten és 39°C -on, 5 % CO_2 tartalmú levegő bevezetése mellett, Allen médiumban (64).

A *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algát 40 W/m^2 intenzitású fényen, fotoheterotróf módon, TAP mediumban tenyésztettük (65).

A *Chlorella* zöld algát a József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszékéről, Dr. Lehoczky Endrétől kaptuk, majd az általuk kidolgozott körülmények között neveltük.

Dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana SR1) növényeket üvegházi körülmények között, 25°C -on, és különböző cukorkoncentrációjú (0.3 és 3%) táptalajon, termosztátszobában, 20 W/m^2 intenzitású fényen neveltük.

A borsó (*Pisum sativum* L.) növényeket szintén üvegházi körülmények között

neveltük.

A táptalajok és a felhasznált médiumok összetételét a függelékben részletezem.

4.2. Preparatív eljárások

4.2.1. Protoplasztisz

Az izolálást üvegházban nevelt 4-6 levéllel rendelkező vagy termosztátszobában, különböző cukorkoncentrációjú táptalajon nevelt dohányból végeztem (66). Az izolálás menete mindkét esetben megegyezett. A leveleket összegyűjtöttem, apró szeletekre vágtam majd fél órán keresztül plazmolizáltam K3 médiumban pH=5.6-nál 0.4 M-os szorbitot használva ozmotikus stabilizátorként (67). Fél óra elteltével a szeletekre vágott dohányleveleket 0.4 M szacharózt, 1% celluláz R-10 és 0.5% macerozim R-10 enzimet tartalmazó K3 médiumba tettem. Az emésztés egy éjszakán át történt. Az emésztetlenül maradt levéldarabokat 40 μ m-es szűrővel eltávolítottam, majd a protoplasztiszokat tartalmazó szuszpenziót Pasteur-pipettával egy zárható centrifugacsőbe tettem és 200 g-vel 3 percen át centrifugáltam. A protoplasztisz a felszínen összegyűlt, ahonnan egy másik centrifugacsőbe tettem és kétszeri cukormentes W5 pufferrel történő mosás után, melyet 100 g-n 5 percig végeztem, a cső alján összegyűjtöttem. A protoplasztisz szuszpenziót felhasználásig

szobahőmérsékleten tartottam. A protoplasztiszok életképességét (intaktságát) táptalajra téve jellemezhetjük. Az ilyen módszerrel izolált protoplasztiszok életképességére jellemző adat, hogy kb. 80%-os arányban voltak képesek kolóniákat alkotni.

4.2.2. Intakt kloroplasztisz

Intakt kloroplasztiszokat, melyek megtartják határhártya (envelop) membránjukat, kéthetes üvegházban nevelt borsóból izoláltam (68). A lecsipegetett leveleket ollóval összeaprítottam és mixerbe raktam annyit, hogy az izoláló médium (0,35 mM szorbit, 20 mM Tricin/KOH, 0,2 mM $MgCl_2$, pH=7,7) ellepje. A legkisebb fordulaton 5 s-ig aprítottam, majd a durva kloroplasztisz szuszpenziót 20 μ m-es 8 rétegű nylon szűrőn választottam el a fel nem tárt szövet daraboktól. Ezután centrifugálással (1 perc alatt 500 g) eltávolítottam a törmeléket, az intakt kloroplasztiszokat pedig centrifugálással (1500 g-n 45 s alatt) leülepítettem. Az üledéket a szuszpendáló médiumban (0,35 mM szorbit, 20 mM Tricin/KOH, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH=7,7), ecsettel nagyon óvatosan felszuszpendáltam és ismét 1500 g-n 45 s alatt leülepítettem.

Intakt kloroplasztiszok elválasztására alkalmaztunk egy másik módszert is. A törmeléktől megszabadított kloroplasztiszokat Percoll-pufferben (22 % Percoll, 50 mM Tris/HCl, 300 mM szorbit, 3 mM EDTA, 2 mM Merkпто-EtOH, 0,1 % BSA, 3 % PEG

6000, pH=8) szuszpendáltuk fel. Ez után 36000 g-n 20 percig centrifugáltuk. Az intakt kloroplasztiszok egy sötétzöld gyűrűt alkottak a kialakult folyamatos gradiensen. A gyűrűt Pasteur-pipettával eltávolítottam, majd 5-10 % MOPS tartalmú pufferben újraszuszpendáltam. Egy 10 percig tartó 1300 g-n történő centrifugálás végén a Percoll-mentes intakt kloroplasztisz a cső alján gyűlik össze.

A kloroplasztiszok intaktságát mindkét esetben ferricianidos próbával határoztuk meg (69). A meghatározás azon alapul, hogy a Hill-reakcióban elektronakceptor ferricianid számára a kloroplasztisz határhártyája átjárhatatlan. Intakt kloroplasztiszok tehát ferricianid Hill-reakciót nem mutatnak, míg határhártyájukat eltávolítva erre képesek. A kloroplasztisz ill. tilakoid membrán szuszpenzióhoz adott ferricianid fényindukált abszorpcióváltozását 420 nm-en határozhatjuk meg. A redukció sebességét először intakt kloroplasztiszokat tartalmazó szuszpenzióban, majd az ebből ozmotikus feltöréssel készített tilakoid membránokban végeztem. (A feltörés 20 mM tricint és 3 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazó pufferrel történt. A feltörés után kétszertömény szuszpendáló médiummal állítottam vissza az eredeti koncentrációviszonyokat.) A két abszorpcióváltozás egymáshoz viszonyított arányából kiszámítható a kloroplasztisz intaktságának mértéke.

Az izolálás során minden műveletet 4 °C alatt kell végezni. Az intakt kloroplasztisz kb. 6 órán keresztül használható fel.

4.2.3. Tilakoid membrán

A tilakoid membránokat intakt kloroplasztiszból nyertem ozmotikus feltörés után. (Tapasztalataink szerint, ha a törő médiumban MgCl_2 is van, kompaktabb tilakoid membránrendszert nyerhetünk.) A különböző reakciók mérése során a szuszpenzió mind az intakt kloroplasztisznál, mind a tilakoid membránnál 0.35 M szorbitolt, 5 mM MgCl_2 -t és 20 mM Tricin/KOH-t tartalmazott (pH=7.6).

4.2.4. Kloroplasztisz határhártya és a sztróma folyadék

Intakt kloroplasztiszból indultam ki, hasonlóan mint a tilakoid membrán izolálása során. Ebben az esetben azonban az ozmotikus feltörés után 6000 g-vel leülepttettem a tilakoid membránokat. A felülúszó, igen alacsony klorofill tartalmú szuszpenzió tartalmazza mind az envelop membránokat, mind a sztróma folyadékot. Az izolálás minden lépésében 1 mM PMSF proteázgátló volt jelen. A hőmérsékletet 0 és 4 °C között tartottuk.

4.2.5. Kloroplasztisz határhártya

1 kg spenótból a fent leírt módszerrel intakt kloroplasztiszt izoláltam majd 0,75,

1, 1,5 M-os, lépcsős cukorgrádiensen tisztítottam. 10 mM Tricin (pH=7.6) és 4 mM MgCl_2 oldatában a kloroplasztisz határhártyáját eltávolítottam, majd 0,93 M és 0,6 M-os cukorgradiensre rétegeztem a szuszpenziót. Az envelop szubfrakciót a 0,6/0,93 M-os cukor határán gyűjtöttem össze 1 órás 72000 g-n történő centrifugálás után. A két különböző sűrűségű cukor határán kialakuló, sárga színű gyűrűt Pasteur-pipettával gyűjtöttem össze és 45 percig 113000 g-vel leüleptítettem. Az izolálást 1 mM PMSF jelenlétében 4°C-on végeztem (70).

4.3. Műszeres mérő módszerek

Ahol nem említtem a műszerek típusait, ott különböző konfigurációkat használtunk. A klorofillkoncentráció 30 $\mu\text{g/ml}$, ha a szövegben erre külön utalás nem történik.

4.3.1. A klorofilltartalom meghatározása

A klorofilltartalom meghatározása Arnon módszerével történt (71). A kloroplasztisz szuszpenziót 80%-os acetonba téve a mérést zavaró fehérjék kicsaphatók és centrifugálással eltávolíthatók. A K1 a és b abszorpcióját 664 és 646 nm-en mértük ($A_{664} \cdot A_{646}$). A spektrofotométert 720 nm-re nulláztuk. A K1 a és b

tartalom az alábbi módon számítható:

$$Kl\ a = 12,7 * A_{664} - 2,69 * A_{646}$$

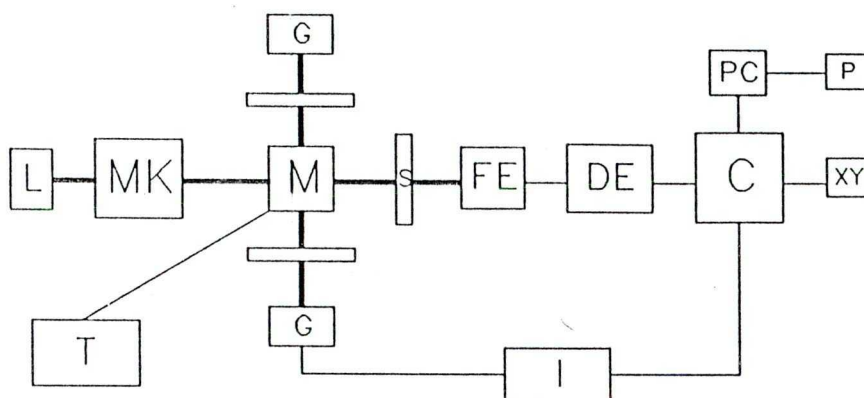
$$Kl\ b = 22,9 * A_{646} - 4,68 * A_{664}$$

4.3.2. Elektrokróm abszorpcióváltozás mérése

A fényindukált töltésszétválasztás és az ezt követő töltésmozgások miatt felépül egy transzmembrán elektromos tér, amely 10^5 V/cm nagyságrendű. A töltésszétválás eredményeképpen a membrán belső oldala pozitív, a sztróma felé eső oldala pedig negatív lesz. A membránba ágyazott pigmentek abszorpciós sávjai az elektromos tér hatására eltolódnak, mely a pigmentek elektrokróm abszorpcióváltozásaként detektálható (72). Technikai okok miatt ez legkönnyebben 460 és 540 nm között, a Kl b és a karotinoidok abszorpciós tartományában mérhető; 515 nm-nél abszorpciónövekedés, ezzel párhuzamosan 478 nm-nél pedig abszorpciósökkenés következik be. A kloroplasztisz tilakoid membránokban az elektrokróm abszorpciós tranzienszt a pozitív maximumhely után 515 nm-es abszorpcióváltozásnak (ΔA_{515}) is nevezik.

A mérőrendszerünkben a küvettában lévő mintára egy monokromátorral beállított 515 nm hullámhosszúságú fényt bocsájtunk. A gerjesztés két oldalról vörös villanófénnyel történik, programban időzíthető módon. A mintán átjutó fényt

egy fotoelektronsokszorozó detektálja, a jelet egy differenciál erősítőre küldi, amely az egyenfeszültségű komponenst leválasztja. A differenciál erősítő kimenő jelét egy sokcsatornás analízátorral gyűjtjük össze. Az analízátorból átlagolás után nyerjük a kívánt, villanófénnyel indukált abszorpciós kinetikát. Ahol erre külön utalás nem történik, ott a gerjesztés frekvenciája 1 s^{-1} , az ismétlések száma 20. A mérőberendezésünk elrendezése az 5. ábrán látható.



5. ábra A villanófénnyel indukált elektrokróm abszorpciós mérőberendezésének blokkvázlata. L=fényforrás; MK=monokromátor; M=minta; T=termosztáló egység; S=fényszűrő; G=gerjesztő villanófénnyel; FE=fotoelektronsokszorozó; DE=differenciál erősítő; C=CAMAC adatgyűjtő rendszer; PC=számítógép; P=plotter; XY=XY író; I=időzítő egység

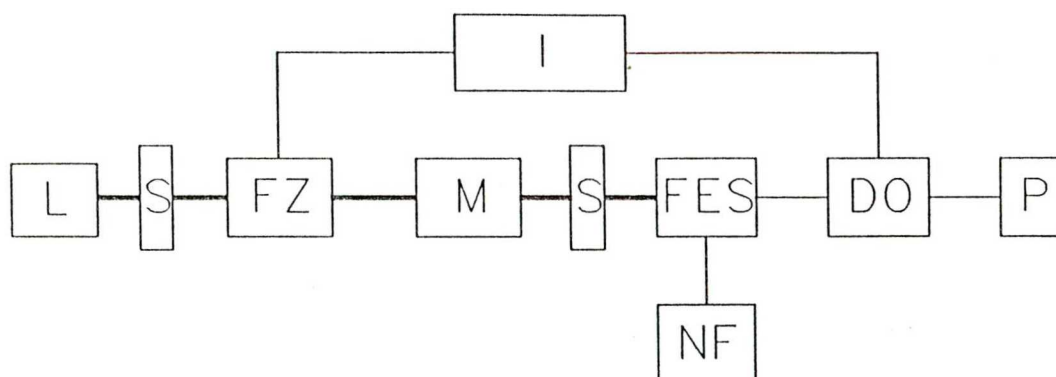
4.3.3. Fluoreszcencia indukció mérése

A fotoszintetikus organizmusokban fénygerjesztéssel vagy kémiai reagensek hozzáadásával vizsgálható a fluoreszcencia tranziens kinetikája. A fluoreszcencia indukció mérésevel értékes információkat nyerhetünk a fotoszintetikus

elektrontranszport rendszerek működéséről.

Vizsgálatainkat leveleken, protoplasztiszokon, kloroplasztiszokon, tilakoid membránokon és különböző algákon végeztük.

A fluoreszcencia jelenségét az elektrontranszport láncban lezajló töltésszétválasztási és tárolási folyamatokkal magyarázhatjuk (73). A Q_A felől a Q_B felé történő elektrontranszport DCMU hozzáadásával gátolható. Ezen gátlószer jelenlétében a fluoreszcencia indukció viszonylag egyszerű kinetikát követ. A megvilágítás kezdetén a fluoreszcencia intenzitása alacsony (F_0). A Q_A fokozatos redukálódásának következtében a fluoreszcencia intenzitása fokozatosan elér egy maximális értéket (F_m). Az F_0 és az F_m különbsége adja a variábilis fluoreszcenciát.



6. ábra A fluoreszcencia indukció mérőberendezés blokkvázlata. L=fényforrás; S=fényszűrő; FZ=elektromos fényzár; M=minta; FES=fotoelektronsokszorozó; NF=nagyfeszültségű tápegység; DO=digitális oszcilloszkóp; P=plotter; I=időzítő egység

Kloroplasztisz szuszpenzióban DCMU hiányában a fluoreszcencia mérés segítségével a plasztokinon redukáltsági fokáról szerezhetünk információkat. A Q_A

teljes redukciójának sebessége, a plasztokinon molekulák gerjesztés előtti redukáltsági fokától függ.

Az 6. ábrán a levelek és izolált rendszerek fluoreszcenciájának mérésére alkalmas berendezés vázlata látható.

4.3.4. Az oxigénfejlesztő képesség mérése

A levelek, protoplasztiszok, kloroplasztiszok és tilakoid membránok oxigénfejlesztésének és fogyasztásának mérése folyamatos telítési megvilágítás mellett Clark-féle elektróddal történt (74).

4.3.5. Az elektrontranszport sebességének mérése

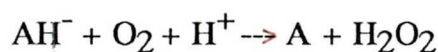
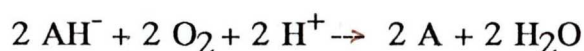
A fotoszintetikus elektrontranszport sebességét a Hill-reakció mérésével határozhatjuk meg, víztől valamilyen Hill-oxidánsig (pl. DCPIP, ferricianid). Az alkalmazott módszer az akceptorok redox állapotának változásán alapul. Az abszorpcióváltozás mérésére AMINCO DW-2 UV/VIS típusú kétsugaras spektrofotométert alkalmaztunk. A két egyforma minta (10 $\mu\text{g/ml}$ klorofill, 15 μM DCPIP vagy 1 mM ferricianid) közül az egyiket megvilágítva, meghatározhatjuk az akceptor időegység alatt bekövetkező abszorpcióváltozását, amelyből számítható az



elektrontranszport sebessége.

4.3.6. A SOD aktivitásának mérése

Az oxigénfogyasztás mérésével, tilakoid membránokban követhetjük a SOD aktivitásának változását. A mérés azon alapul, hogy SOD és MV jelenlétében, mérési körülményeink között, az oxigénfogyasztás felére csökken. Ezt magyarázza az alábbi két reakcióegyenlet:



(AH^- , aszkorbát; A, dehidroaszkorbát)

Az izolált intakt kloroplasztiszokat ozmotikus úton feltörtük és az így nyert tilakoidmembránok oxigénfogyasztását $40 \mu\text{M}$ DCPIP, $100 \mu\text{M}$ MV, 2 mM aszkorbát, $0,8 \text{ mM}$ NaN_3 , $16 \mu\text{M}$ DCMU összetételű pufferben mértük. A NaN_3 a katalázt blokkolta azért, hogy az elektrontranszport a SOD-enzim irányába haladjon tovább és ne az aszkorbát felé. A redukált DCPIP elektrondonor, a DCMU kizárja a PSII-t. A klorofillkoncentráció $15 \mu\text{g/ml}$, a SOD gátlásához szükséges KCN koncentráció pedig 10 mM volt.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

5.1. A klororespiráció kimutatása magasabb rendű növényekben

A fotoszintetikus baktériumokban, cianobaktériumokban és zöld algákban a légzési és fotoszintetikus elektrontranszport lánc szoros kölcsönhatásban áll egymással. A két elektrontranszport lánc elágazása nagy valószínűséggel a citokróm b_6/f komplex környékén található. Prokariótákban ismert, hogy a légzés terminális oxidáza és a fotoszintézis reakciócentruma (cianobaktériumok esetében PSI) verseng az elektronokért.

Ezen eredmények ismeretében célszerűnek tűnt a magasabb rendű növények klororespirációjának vizsgálata során a citokróm b_6/f komplex és a PSI viselkedésének tanulmányozása. Erre a villanófény-indukált elektrokróm abszorpcióváltozás mérésének technikája tűnt legalkalmasabbnak.

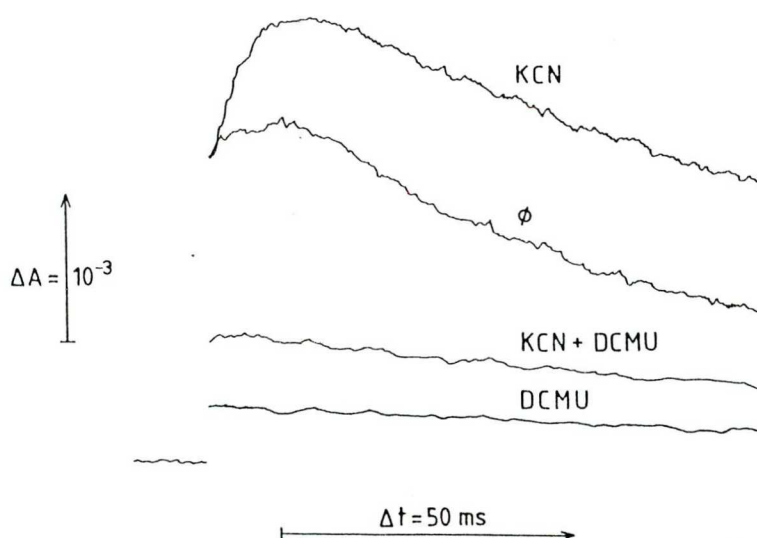
Az 515 nm-nél megfigyelt elektrokróm abszorpcióváltozás kezdő fázisának amplitúdója egyenesen arányos a stabil töltésszétválasztásra képes reakciócentrumok koncentrációjával, amelyek egy rövid (legfeljebb néhány μs -os) telítési gerjesztő villanófény hatására töltést választanak szét. A PS I és PS II közel egyenlő arányban járulnak a kezdő fázis amplitúdójához (75). A lassú (5-10 ms-os) fázis a citokróm b_6/f komplex elektrogén aktivitásából adódik (76). A lecsengés kinetikáját a membrán

permeabilitása ill. az ATP-szintézishez kapcsoltan a protongrádiens megszűnésének sebessége határozza meg.

Ennek a technikának nagy előnye, hogy akár egyetlen gerjesztés után is meg tudjuk mérni az abszorpcióváltozást.

5.1.1. Protoplasztiszok, levelek

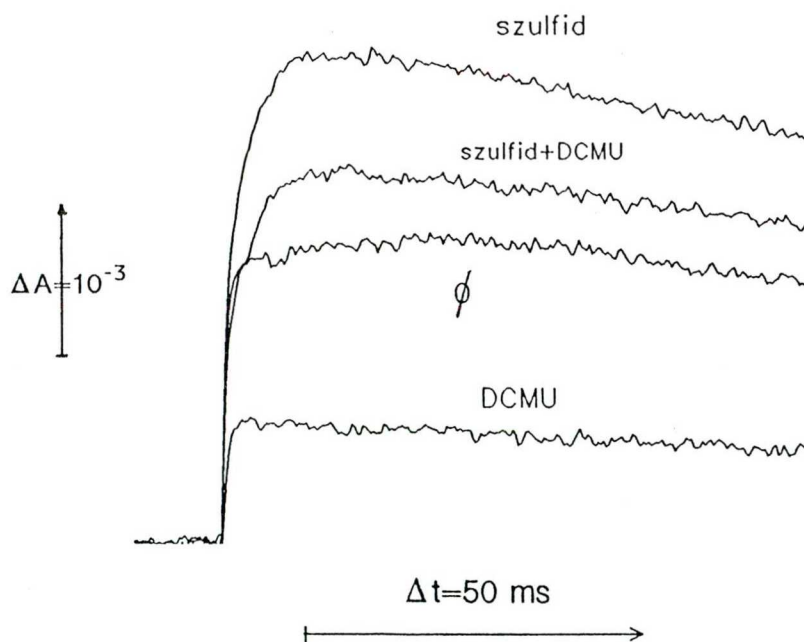
Vizsgálatainkat dohánylevelekből izolált protoplasztiszokon kezdtük, mert a protoplasztiszok optikai tulajdonságai sokkal jobbak, mint a leveleké. A protoplasztiszokon történő vizsgálatok további előnye a sejtszinten kivitelezhető mérés és a pontosan beállítható klorofillkoncentráció is.



7. ábra A dohány protoplasztisz jellemző ΔA_{515} kinetikája. ϕ kontroll. A KCN ill. a DCMU gátlószereket 2 mM ill. 20 μM koncentrációban alkalmaztuk.

A 7. ábrán látható, hogy légzésgátló KCN-t adva dohány protoplasztiszokhoz a ΔA_{515} lassú fázisa jelentős mértékben megnő. A lassú fázis növekedésének kiváltása nem igényelt inkubálást, és a KCN hozzáadása után már az első néhány gerjesztés előidézte.

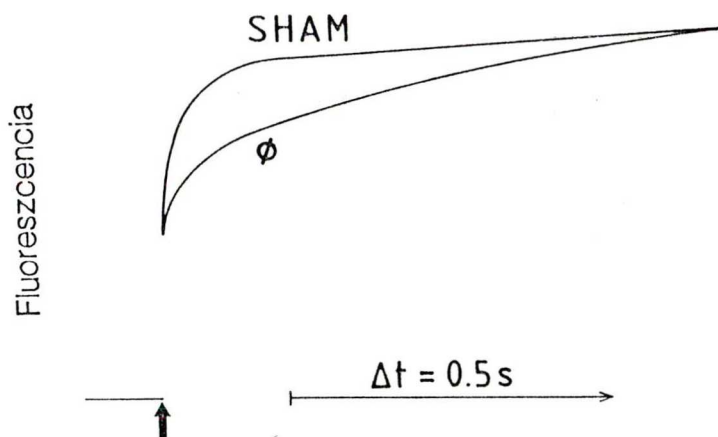
A következő lépésben megpróbáltuk DCMU hozzáadásával, a PSII kizárásával vizsgálni a PSI viselkedését. Mivel DCMU jelenlétében az 515 nm-nél mért kezdő amplitúdó teljes egészében a PSI-ből származik, az ábráról látható, hogy DCMU jelenlétében a PSI reakciócentrumok csupán 40%-a működik. A nem működő PSI reakciócentrumok KCN hozzáadásával közel 80%-ban újraaktiválhatók.



8. ábra A dohány protoplasztisz jellemző ΔA_{515} kinetikája. Ø, kontroll. A Na_2S és a DCMU gátlószereket 6 mM ill. 10 μM koncentrációban alkalmaztuk.

A kísérletet elvégeztük egy másik légzésgátlóval, a Na_2S -dal is (77). Mint ahogy a 8. ábráról látható, teljesen hasonló eredményt kaptunk így is, mint KCN esetében.

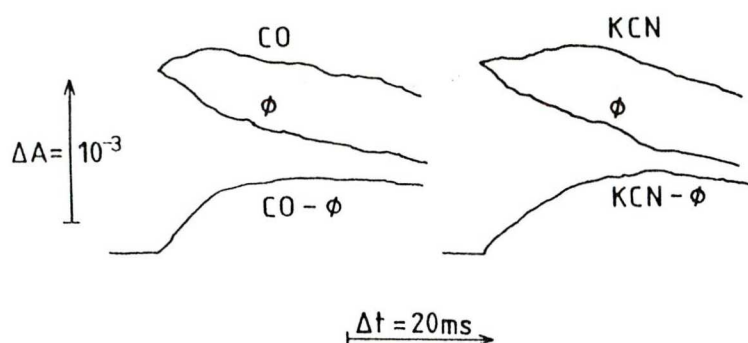
A plasztokinon molekulák redukáltsági állapotát a fluoreszcencia indukció mérésével követhetjük nyomon. A 9. ábrán látható, hogy a cianid-érzéketlen légzési út gátlószerével (SHAM) a plasztokinon molekulák redukáltsági állapota megnövelhető. Ez a megfigyelésünk összhangban van a Bennoun által, *Chlorellán* végzett kísérlettel (62), amellyel a fotoszintézis légzéskontrolljának működését bizonyította egysejtű algákban.



9. ábra A SHAM (5 mM) hatása a dohány protoplasztisz klorofill fluoreszcencia indukció kinetikájára.

A fenti eredményeket enzimatisz emésztéssel előállított protoplasztiszokon nyertük. Elméletileg lehetséges, hogy az izolálás során artifaktumok lépnek fel. Ezt teljes bizonyossággal csak akkor zárhatjuk ki, ha a kísérleteket intakt leveleken is

elvégezzük. A 10. ábrán látható, hogy különböző légzésátlók hozzáadásával a levelek fotoszintézise serkenthető, hasonlóan a protoplasztiszokhoz. Ez a tény igazolja annak jogosságát, hogy kísérleteinket a nehezebben mérhető levelek helyett protoplasztiszokon végeztük.



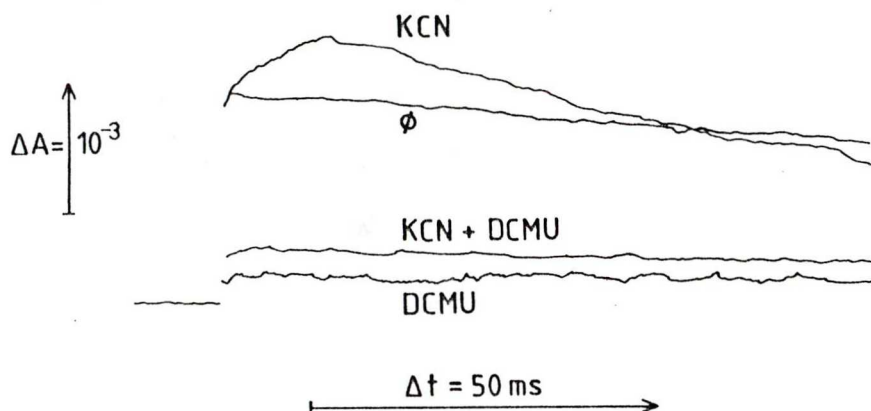
10. ábra A KCN és a CO hatása a dohány levelek ΔA_{515} kinetikájára. A CO-os mérések előtt a leveleket 3 percig CO-ban gazdag atmoszférában inkubáltuk. (Hasonló körülmények között az N_2 hatástalan.) A kezelések előtt a levelek alsó epidermiszét eltávolítottuk, hogy a gátlószerek könnyebben bejuthassanak a sejtekbe. A KCN-t a vízzel töltött küvetába adtuk 5 mM végkoncentrációban. A CO- $\emptyset$ és a KCN- $\emptyset$ jelölésű görbék a CO-dal és KCN-nel kezelt minták és a kontroll különbségei.

5.1.2. Izolált kloroplasztisz, tilakoid membránok

Annak eldöntésére, hogy melyik az a legkisebb szervezeti egység amely még képes a klororespirációra, vizsgálatainkat kiterjesztettük "open-cell" preparátumokra, izolált intakt kloroplasztiszokra és tilakoid membránokra is.

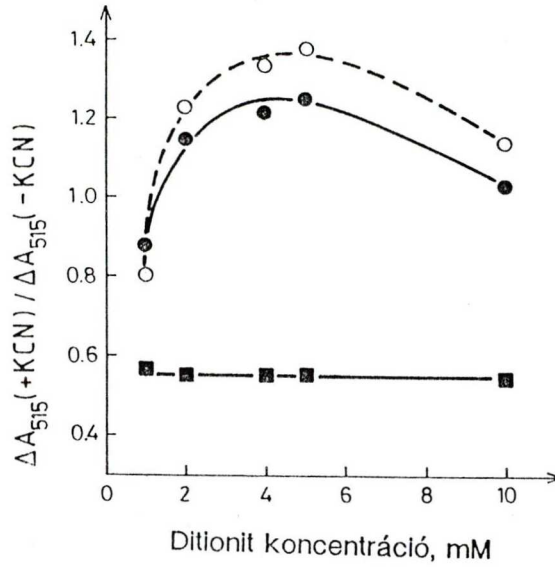
Az "open-cell" preparátumot protoplasztiszokból, a sejtmembrán ozmotikus

feltörésével nyertük. Az "open-cell" preparátum esetén a kloroplasztisz sértetlen marad, azaz megtartja határhártyáját. Az 11. ábrán látható, hogy légzésgátló hozzáadására a ΔA_{515} minőségileg hasonló lassúfázis serkentést kaptunk, mint protoplasztisz esetében.



11. ábra A dohány protoplasztiszokból, ozmotikus feltöréssel nyert "open-cell" preparátum jellemző ΔA_{515} kinetikája. A koncentrációviszonyok és jelölések megegyeznek az 7. ábráéval.

Ellentétben a sejtkörnyezetben található kloroplasztiszok viselkedésével (vö. 7. ábra), DCMU-val gátolt, izolált intakt kloroplasztiszokban ditionit hiányában illetve alacsony ditionit koncentráció esetén ($<0,5 \text{ mM}$) nem mutatható ki a klororespiráció működése (12. ábra). Ditionit jelenlétében (amely a PSI elektrondonorait redukálja és feltehetőleg a citoszolból érkező redukáló erőt pótolja) mind a kezdő amplitúdó mind a lassúfázis serkentése jól megfigyelhető.



12. ábra A KCN-indukált ΔA_{515} kezdő amplitúdó és a lassú fázis növekedésének függése a ditionit koncentrációtól. (•—•), az intakt borsó kloroplasztisz, (■—■) és a tilakoid membrán ΔA_{515} kezdő amplitúdója; (o—o) az intakt kloroplasztisz ΔA_{515} lassú fázisa. Minden mintában 20 μM DCMU volt jelen.

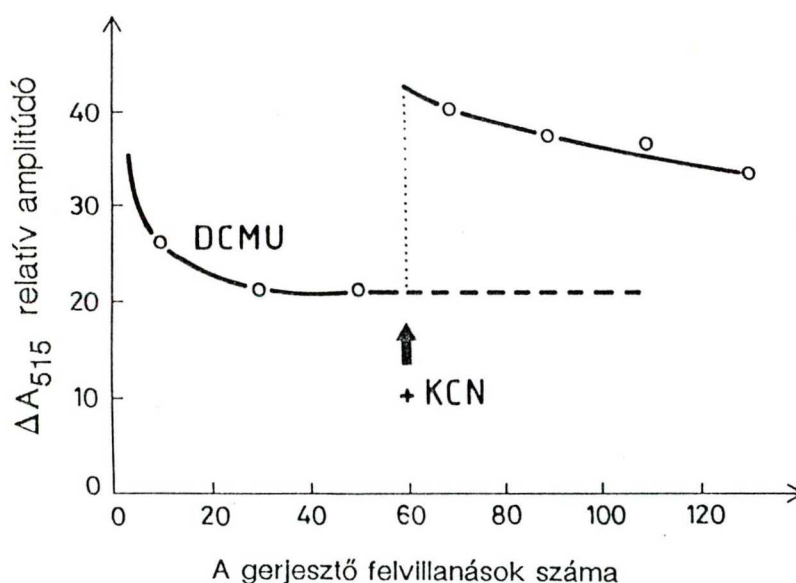
A ditionitkoncentráció növekedésével nő azon elektronok száma, amelyekért a fotoszintézis és a klororespiráció versenyezhet. Ebben az esetben a KCN serkentése egyre kifejezettebbé válik (felfutó szakasz). Az ábráról az is kitűnik, hogy magas ditionit koncentráció esetében (>5 mM) egyre több PSI reakciócentrum képes a töltésszétválasztásra az ismétlődő villanófény gerjesztés hatására és ezért a KCN-serkentés valamelyest csökken.

Egy szervezeti fokkal lejjebb, izolált tilakoid membránok esetében nem tudtunk KCN-indukált változást kimutatni. Az 12. ábrán látható ΔA_{515} kezdő

amplitúdójának csökkenését a jelenlévő 5 mM KCN hatására fellépő fotoszintetikus elektrontranszport részleges gátlása okozza (vö. 17. ábra).

5.2. A klororespiráció és a fotoszintézis versengése

Az eddigi kísérletekkel kimutattuk, hogy a kloroplasztiszból található egy légzési elektrontranszport lánc (vagy lánc darab). A továbbiakban arra keressük a választ, hogy milyen kölcsönhatásban áll a klororespiráció és a fotoszintézis a kloroplasztiszon belül.

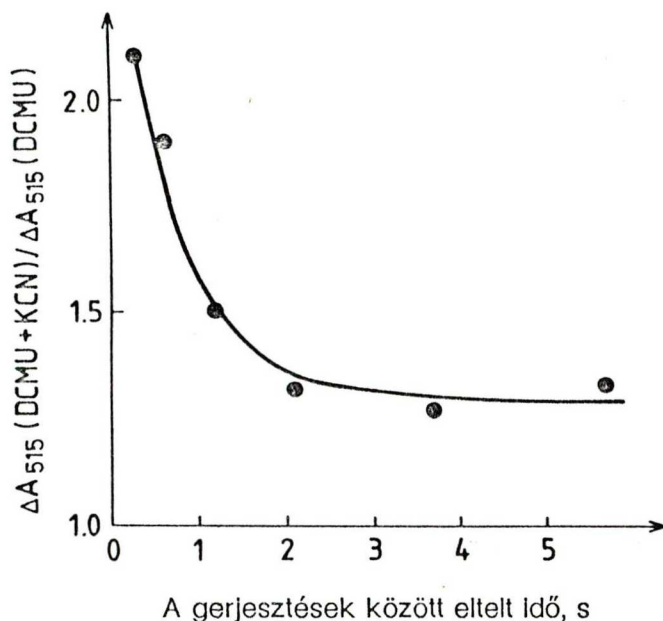


13. ábra A KCN hatása a ΔA_{515} amplitúdójára, 1 ms-al a villanófény-gerjesztés után. Az adatok a kezeletlen dohány protoplasztiszokban nyert értékekre (100) vannak normalizálva.

Ha a DCMU-val gátolt protoplasztiszokat nagyszámú villanófénnyel gerjesztettük azt tapasztaltuk, hogy a PSI aktivitásának mintegy 40%-a marad meg. (Ez egyúttal azt is mutatja, hogy a PSI nem csak a PSII-től kap elektronokat.) Az 13. ábrán látható, hogy a plasztokinon molekulák felől áramló elektronokért a klororespiráció verseng a PSI-gyel. Ha ui. a klororespirációt KCN-el gátoljuk akkor az összes elektron a PSI felé vándorol. Az ábráról az is jól látható, hogy a PSI aktivitásának növekedését már egyetlen gerjesztés is kiváltja és ez a magasabb aktivitás hosszú időn keresztül megmarad.

A fenti adatok jól értelmezhetők úgy, hogy a klororespiráció verseng a rendelkezésre álló redukáló erőért. Cianidgátlással a versengés megszüntethető és a PSI aktivitása serkenthető. Ennek fényében várható, hogy a villanógerjesztések közötti sötétintervallum csökkentésével a PSI aktivitását egyre inkább korlátozza a klororespiráció. A korlátozás mértékét a 14. ábrán bemutatott mérés alapján a cianid-serkentés mértékével jellemezhetjük. Mint azt a 14. ábra mutatja - összhangban azzal, amit a versengés alapján vártunk - a gerjesztések közötti idő csökkentésével a cianid serkentés egyre erőteljesebbé válik ($\Delta t \leq 2s$). Egyszerű versengés feltételezésével azonban nem magyarázható az a megfigyelésünk hogy a hosszabb gerjesztési időközök esetén sem áll elegendő redukáló erő a PSI rendelkezésére ill. a klororespiráció továbbra is számottevő mértékben korlátozza a PSI aktivitását. Ezért feltételezhető, hogy a klororespirációs és a fotoszintetikus

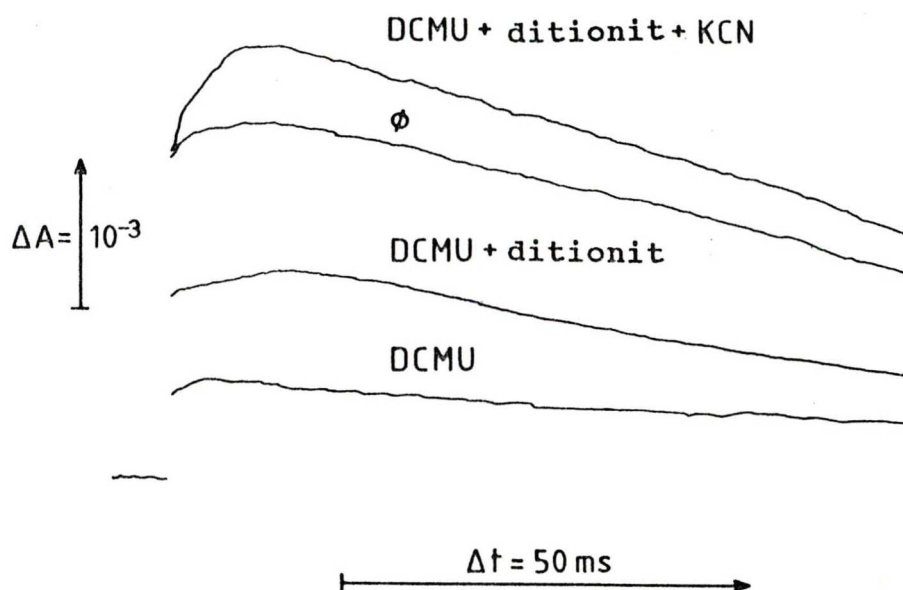
elektrontranszport versengését nem kizárólag a plasztokinon molekulákban tárolt redukáló erő szabályozza, hanem az pl. az elektrontranszport elágazásánál befolyásolható.



14. ábra A KCN-indukált ΔA_{515} amplitúdónövekedés függése dohány protoplastiszokban a gerjesztő felvillanások között eltelt idő függvényében.

A fotoszintézis és a klororespiráció kompetícióját megvizsgáltuk abban az esetben is, ha a plasztokinon molekulák redukált állapotban vannak. Az eredményeket az 15. ábra szemlélteti. A ΔA_{515} kezdő amplitúdója DCMU és ditionit jelenlétében kb. fele, mint a kontrollban (azaz a PSI aktivitás megegyezik a kontrolléval). Ez nem lenne meglepő hiszen tudjuk, hogy 2 mM ditionit a plasztokinon molekulák teljes mennyiségét képes redukálni. KCN hozzáadására azonban a töltésszétválasztásra

képes PSI reakciócentrumok mennyisége kb. kétszerese a kontrollban működőhöz viszonyítva. Ez a kísérlet bizonyítja, hogy a ditionit egyedül, habár elegendő redukáló erőt biztosít a plasztokinon molekulák redukációjához, nem képes az összes PSI reakciócentrum működtetésére. Ezek a "tartalék" reakciócentrumok a klororespiráció blokkolásával aktiválódnak.

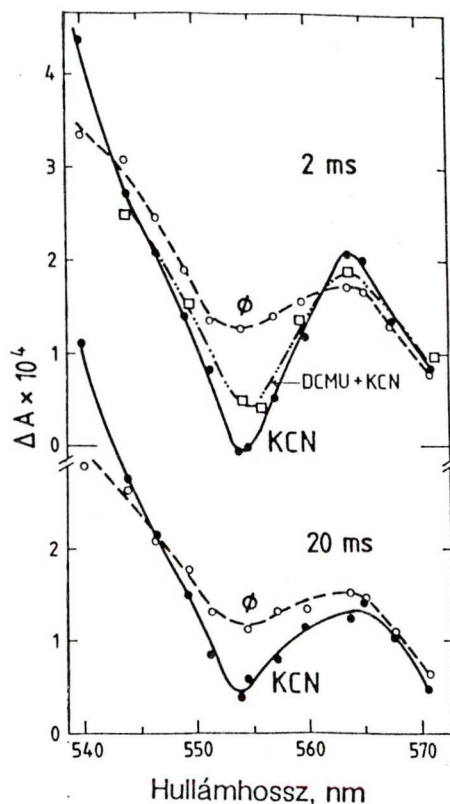


15. ábra A dohány protoplasztiszok tipikus ΔA_{515} kinetikája 20 μM DCMU, 2 mM ditionit és 2 mM KCN jelenlétében és hiányában.

A légzési és fotoszintetikus elektrontranszport versengése "éheztetett", 1-2 napig sötétben tartott levelekből izolált protoplasztiszok esetén még szembetűnőbb volt. Ezekben a mintákban a KCN nem csak a lassúfázist serkentette, hanem a ΔA_{515} kezdő amplitúdóját is. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy sok reakciócentrum inaktív a villanófény-gerjesztés alatt, azonban ezek a "tartalék" reakciócentrumok KCN hatására

aktiválódnak.

A citokróm b_6/f komplex redox állapota az eddig alkalmazott közvetett hatáson alapuló mérés technikán túl közvetlenül is mérhető. A 16. ábrán a citokróm b_6 és f abszorpciós tranziensei láthatók.



16. ábra Az éheztetett dohányból izolált protoplasztiszok abszorpciós tranziens spektrumai. A felső görbék értékeit 2 ms-al, az alsó görbék értékeit 20 ms-al a villanófény-gerjesztés után kaptuk. Ø, kontroll; a többi görbe 2 mM KCN és 20 μ M DCMU jelenlétében, a jelölés értelmében. Az 515 nm-nél mért relatív amplitúdók a következők voltak: Ø, 100; KCN, 128; DCMU, 20; KCN+DCMU, 60

Az ábra szemléletesen mutatja, hogy KCN hiányában a citokróm b_6 és f mennyisége, amely redukálódik ill. oxidálódik egyetlen gerjesztés hatására, nagyon

kicsiny. KCN hozzáadása után azonban a villanófény kiváltotta redox állapotváltozáson átesett citokróm b_6 és f mennyisége igen nagy mértékben megnőtt. Ez a magasabb rendű növények protoplasztiszaiban mért citokróm b_6/f komplex aktivitásának növekedése nagyon hasonló a Houchins és Hind által, heterocisztákban megfigyelthez (44). A citokróm b_6/f komplex KCN-indukált aktivitás növekedését ftoheterotróf körülmények között nevelt cianobaktériumok esetében is kimutatták (78).

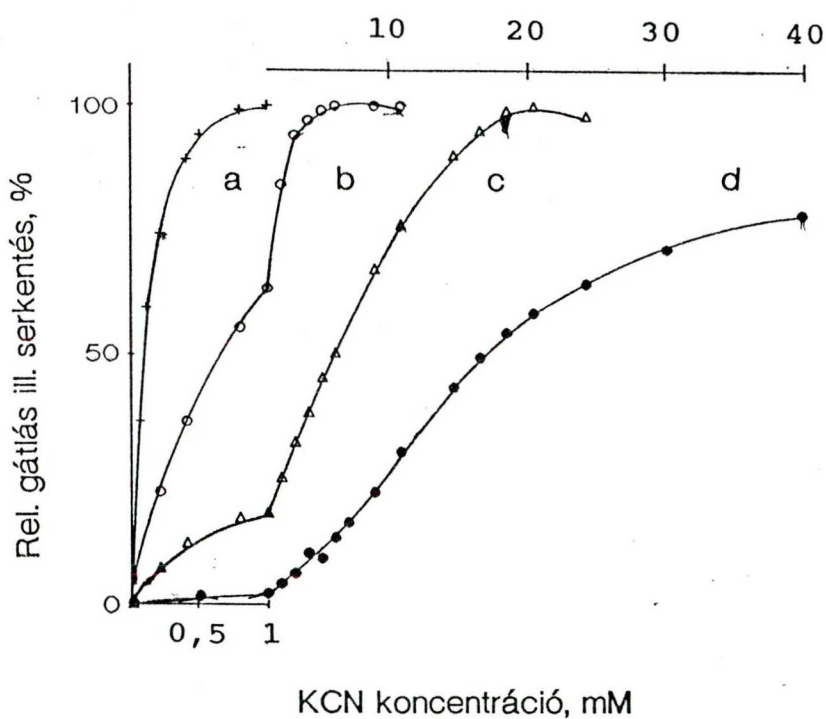
5.3. A cianid hatóhelyeinek elkülönítése

Mivel a dolgozatomban a KCN-nek kitüntetett szerepe van, fontos a kémiai hatásmechanizmusának és az élő rendszerekben előidézett hatásainak tisztázása.

A cianidok hatásmechanizmusa azon alapul, hogy számos átmeneti fémmel (pl. Ag, Fe, Cu) igen stabil komplexet képez. Biológiai, légzésbénító hatása azzal magyarázható, hogy a kétértékű réz és a háromértékű vasat tartalmazó oxidatív enzimek erősebb kötést létesítenek a cianiddal, mint az oxigénnel és ezáltal az oxigénellátás szempontjából legérzékenyebb szerveket károsítja. A KCN károsító hatásával tehát minden olyan enzim és fehérjemolekula esetében számolni kell, ahol a központi fém réz vagy vas.

A klororespiráció vizsgálata során a KCN négy különböző hatóhelyét

különítettük el (17. ábra). A KCN jelenlétére legérzékenyebb a mitokondriális légzés (mitorespiráció). A mitokondrium alternatív légzési útjának blokkolásával (szelektív gátlószere a SHAM), a sötétlégzés 50%-a már 40 μ M KCN hozzáadásával gátolható (a görbe). (Az alternatív légzés blokkolása nélkül, az oxigénfogyasztás szempontjából, a KCN hatástalan, hiszen a cianid-érzékeny légzési út szerepét átveszi az alternatív légzési elektrontranszport.)



17. ábra A KCN relatív gátló hatása protoplaziszokban és tilakoid membránokban. (a) A mitokondriális légzés gátlása protoplasztiszokban. (b) A klororespiráció gátlása protoplasztiszokban. (c) A SOD enzim gátlása tilakoid membránokban. (d) A fotoszintetikus elektrontranszport lánc gátlása tilakoid membránokban.

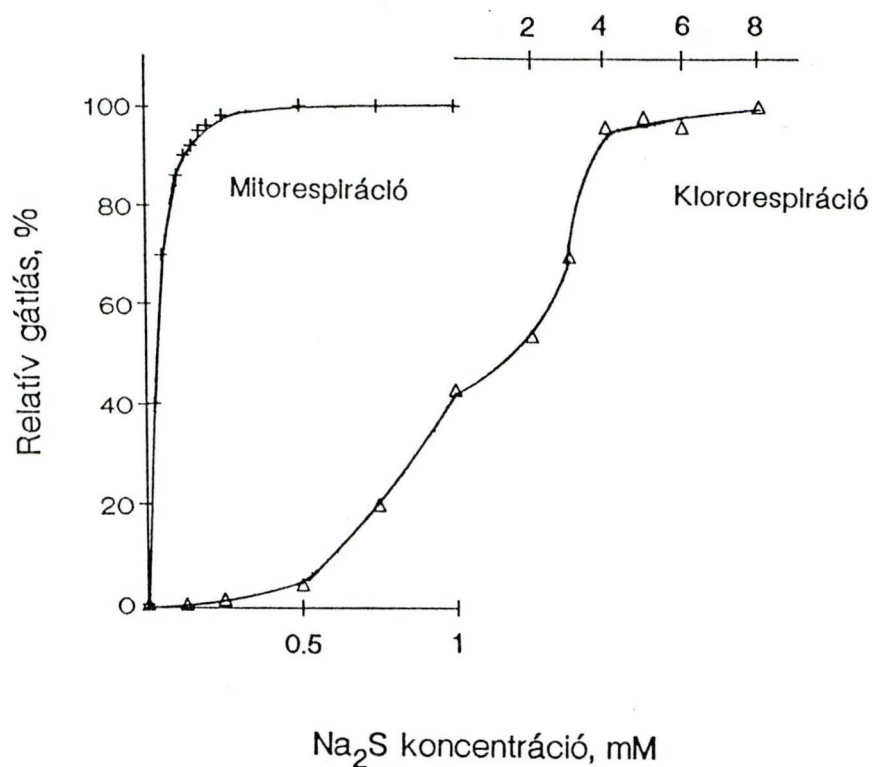
A KCN a mitokondriális légzés blokkolásán túl a kloroplasztiszok tilakoid

membránjában gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot is. Hatásmechanizmusa azon alapul, hogy a plasztocianin központi rezével komplexet képez, így a plasztocianin működésképtelenné válik. A plasztocianin teljes gátlásához 50 mM KCN szükséges és kb. 30 perc inkubálás (79). Inkubálás nélkül, az általunk használt mérési körülmények között (≤ 5 mM KCN), a fotoszintetikus elektrontranszport lánc csak 10%-ban gátlódik (d görbe).

A KCN egy további hatóhelye a kloroplasztiszban a szuperoxid-dizmutáz enzim gátlása. A SOD gátlása szintén a központi réz komplexbe vitelén alapul. 10-20 mM KCN képes a SOD enzim aktivitását teljes mértékben gátolni (c görbe), ami az oxigénfejlesztés 50%-os csökkenését okozza.

Az eddigiekben a KCN minden esetben gátlószerként működött. Egyetlen esetben találtunk serkentést, mégpedig a cianid megnövelte a citokróm b_6/f és a PSI aktivitását (b görbe). Ez a serkentés a klororespiráció gátlásán alapul.

A 17. ábrán látható, hogy a KCN hatóhelyeit a hatásos koncentrációk alapján élesen elkülöníthetjük egymástól. Egy másik légzésgátlóval, a Na_2S -dal is jól szétválasztható a mitorespiráció és a klororespiráció. A Na_2S csupán 100-szor nagyobb koncentrációban képes a klororespiráció gátlására, mint a mitokondriális légzésére (18. ábra).



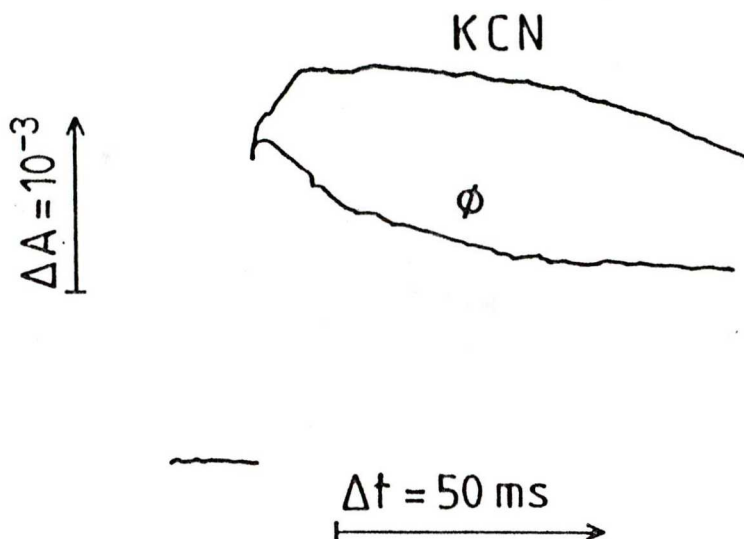
18. ábra A szulfid relatív gátló hatása dohány protoplasztiszokban.

5.4. A magasabbrendű növények összehasonlítása cianobaktériumokkal és egysejtű algákkal

5.4.1. Klororespiráció egysejtű algákban

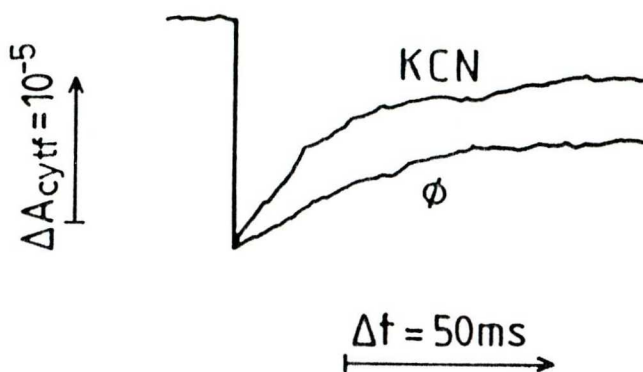
Zöld algákban a klororespirációt ugyan már korábban kimutatták, de az általunk használt mérési technikák segítséget nyújthatnak további részletek tisztázásában. Célunk a zöld algákkal végzett kísérletekkel nem csak a klororespiráció részleteinek

tisztázása az algákban, hanem a kapott eredmények összehasonlítása a magasabb rendű növényekben már bemutatott eredményekkel.



19. ábra A *Chlamydomonas* zöld alga jellemző ΔA_{515} kinetikája. $\emptyset$ kontroll, a felső görbe 2mM KCN jelenlétében.

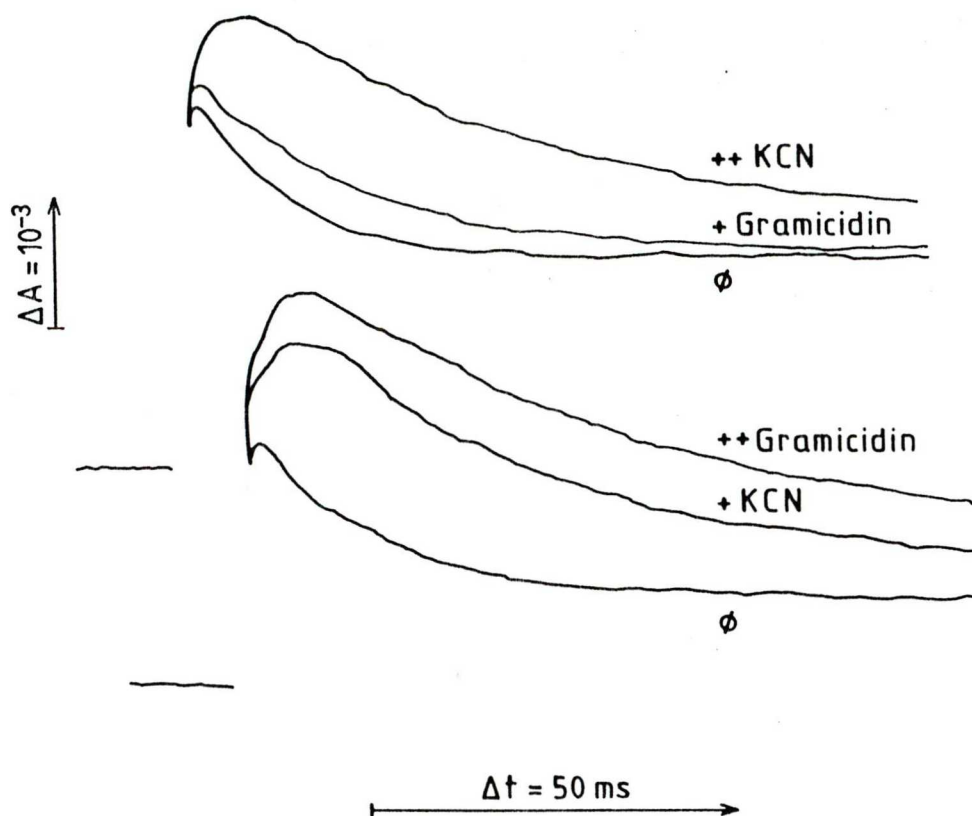
Az 19. ábrán látható, hogy KCN-t adva *Chlamydomonas* zöld algához a 515 nm-nél mért abszorpcióváltozás lassúfázisa jelentős mértékben megnőtt. Itt azonban meg kell jegyezni, hogy ez a lassúfázis növekedés nem következett be minden esetben. Ugyanazon tenyészetből, különböző időpontokban vett minták eltérően viselkedtek a légzésgátlószerekkel szemben. Ugyanez volt a helyzet a citokróm f közvetlen mérésénél is, de a tipikus aktivitás növekedés a 20. ábrán jól látható.



20. ábra A *Chlamydomonas reinhardtii* jellemző citokróm f kinetikája. $\emptyset$, kontroll; a KCN-t 2 mM koncentrációban adagoltuk.

Cianobaktériumokban a korábbi kísérletek azt bizonyították, hogy a légzési elektrontranszport termodinamikus kontroll alatt áll (33). Kíváncsiak voltunk, ez vajon zöld algák esetében is így van-e. Ezért megvizsgáltuk *Chlamydomonas*-on a szétkapcsolók hatását. A vizsgálat eredményeként megállapítottuk, mint ahogy a 21. ábra is mutatja, hogy a KCN-nel és gramicidinnel együttesen kezelt mintákban a citokróm b_6/f komplex aktivitása jóval nagyobb, mint a külön-külön kezelt mintákban. Hasonló eredményeket kaptunk más szétkapcsolókkal is (pl. NH_4Cl , CCCP, Nonactin, Valinomycin).

Chlorellá-n és *Chlamydomonas*-on megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását a klororespirációra. Ennek eredményéről, élettani jelentősége miatt az 5.6. fejezetben fogok beszámolni.



21. ábra A gramicidin hatása a *Chlamydomonas reinhardtii* ΔA_{515} kinetikájára. A gramicidint $1 \mu\text{M}$ a KCN-ot 2 mM koncentrációban alkalmaztuk.

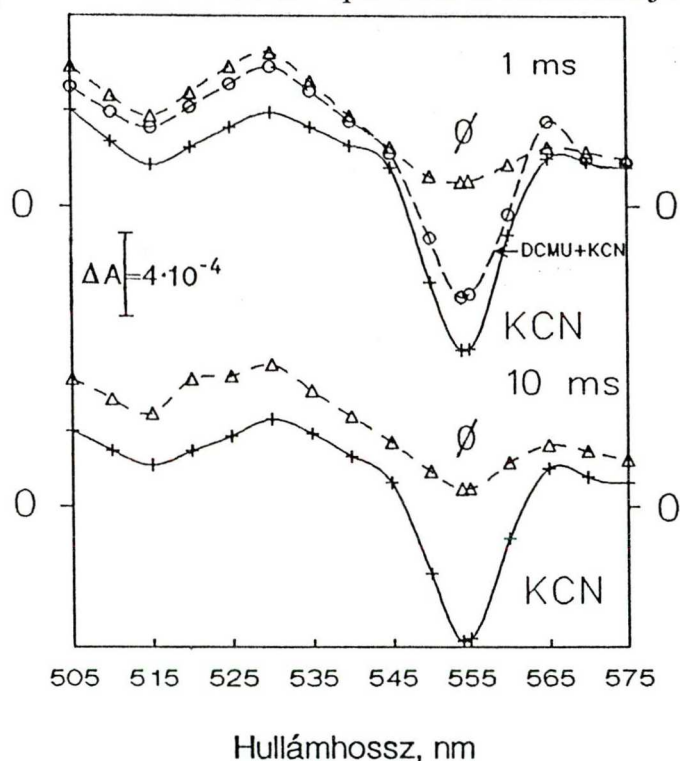
5.4.2. A légzés és a fotoszintézis kölcsönhatása cianobaktériumokban

A cianobaktériumok esetében nem beszélhetünk klororespirációról, hiszen itt még nem alakultak ki az önálló sejtszervecskék, így a kloroplasztisz sem. A légzés és a fotoszintézis kölcsönhatásának vizsgálata azonban segítségünkre lehet a magasabb



rendű növényekben megtalálható klororespiráció és a fotoszintézis egymáshoz való viszonyának vizsgálatában.

Ezért *Anacystis*-ben is megvizsgáltuk a KCN hatását az 515 nm körül kiváltható abszorpcióváltozásra. Az így kapott abszorpcióváltozás kezdő amplitúdójának növekedése nem elektrogén hatáson alapul, ezért közvetlenül nem hasonlítható össze a magasabb rendű növényekben és a zöld algákban, ugyanilyen körülmények között nyert adatokkal. (ezt a 22. ábrán látható spektrum is alátámasztja.)

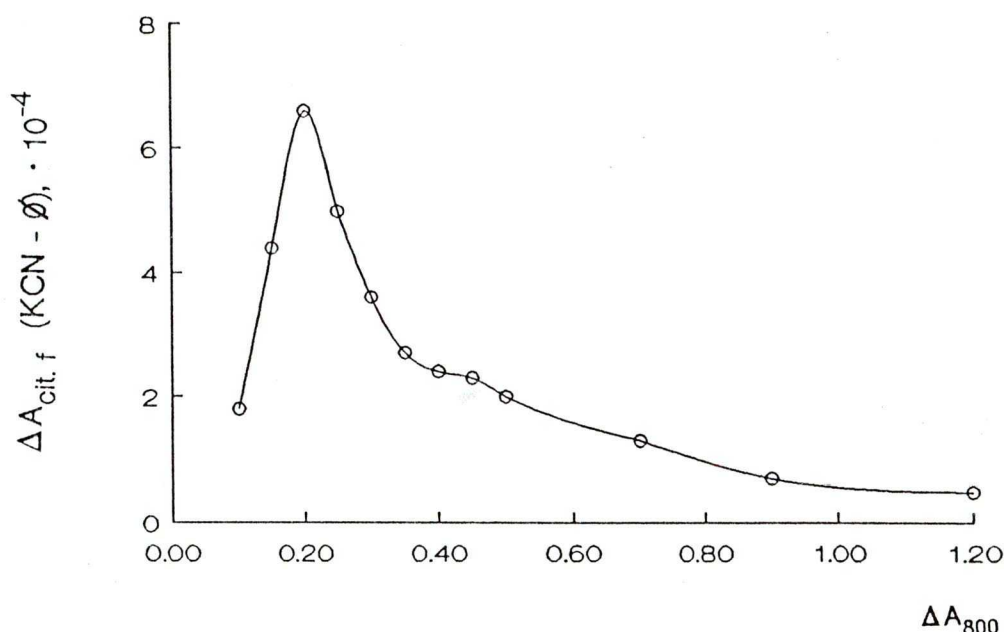


22. ábra Az *Anacystis nidulans* abszorpciós tranziens spektrumai. A felső görbék értékeit 1 ms-mal, az alsó görbék értékeit 10 ms-mal a gerjesztés után kaptuk. Ø, kontroll; a többi görbe 2 mM KCN ill. 10 μ M DCMU jelenlétében, a jelölések értelmében.

A mért amplitúdónövekedés oka ugyan nagy valószínűséggel a légzés és a

fotoszintézis kölcsönhatásának eredménye, de mechanizmusának felderítése további kísérleteket igényel.

A citokróm f közvetlen módszerrel történő mérése már értékelhető eredményekhez vezetett. Ha KCN-t adtunk az *Anacystis*-hez a citokróm f aktivitása jelentős mértékben megnőtt (22. ábra).



23. ábra Az *Anacystis nidulans* KCN-indukált citokróm f aktivitásnövekedése a különböző életkorú sejtek esetében. A minták ugyanazon populációból származnak. Az ábrázolt pontok a cianiddal kezelt és a kontrollban mért citokróm f különbségei. A KCN-t 2 mM koncentrációban alkalmaztuk.

Ezekben a kísérletekben igazán meglepő az *Anacystis* széles határok között változó viselkedése a KCN-nel szemben. Pár órás eltéréssel vett minták egyike reagált a KCN-re, a másokban semmilyen látható változást nem történt. Azért, hogy ennek okát kiderítsük, megvizsgáltuk a citokróm f aktivitásnövekedését az *Anacystis*

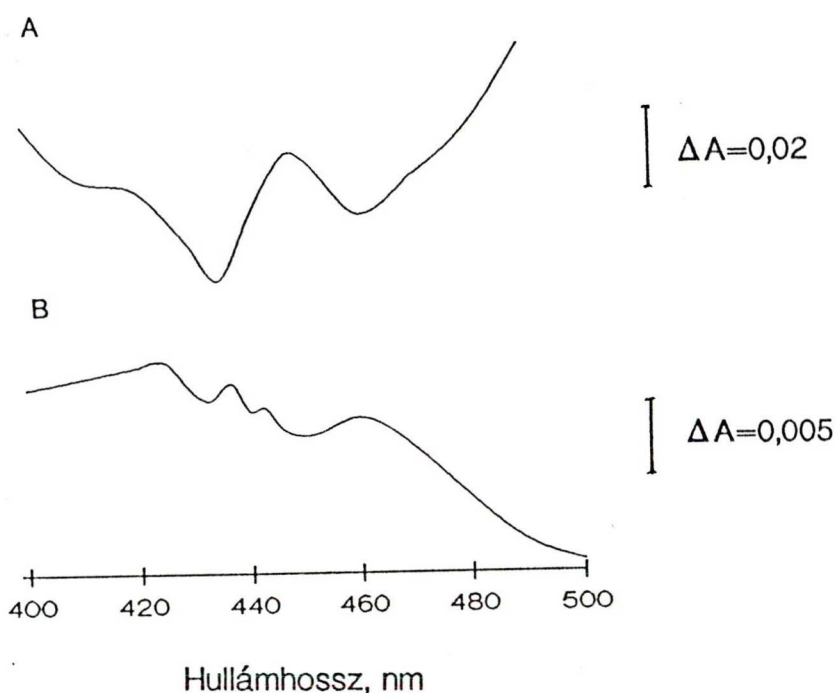
növekedési fázisa folyamán. A 23. ábrán látható, hogy van egy viszonylag szűk tartomány a növekedés során ahol a légzésgátló hatására megnő a citokróm f aktivitás. Ez az ábra jól mutatja, hogy a légzéskontroll szerepe a fiatal sejtek esetében a legerősebb.

5.5. A klororespiráció terminális oxidázának spektroszkópai azonosítása

Az a megfigyelésünk miszerint, ha az intakt kloroplasztiszból tilakoid membránt izolálunk megszűnik a klororespirációs aktivitás (12. ábra), azt valószínűsíti, hogy a kloroplasztisz légzési láncának a terminális oxidáza nem a tilakoid membránban, hanem a sztróma folyadékban vagy a kloroplasztisz határhártyában helyezkedik el. Továbbá az a tény, hogy protoplasztiszból a légzésgátló KCN és a szétkapcsoló gramicidin egymást erősítő kölcsönhatásban áll, azt sugallja, hogy a terminális oxidáz membránkött és helye a kloroplasztisz határhártyájában van (21. ábra). (A gramicidin hatása nem lehet a tilakoid membránban ui. akkor gyorsítania kellene a ΔA_{515} lecsengését.)

A terminális oxidáz azonosítását spektroszkópai mérésekkel kezdtük el. Felvettük a tilakoidmentes sztróma folyadék (tartalmazta az envelop membránokat is) differencia spektrumát 400 és 500 nm között (24. ábra). A felső görbéből látható, hogy a kloroplasztisz sztróma folyadékában található egy komponens, melynek

abszorpciós maximuma 448 nm-nél van. (A széles abszorpciós sáv, amin a 448 nm-s sáv detektálható, valószínűleg az FNR-ből és egyéb nem integrális membrán proteinekből származik.) Az alsó görbe mutatja, hogy ez a komponens rendelkezik CO kötőhellyel is. Ezek az adatok egy aa₃-típusú citokróm jelenlétét valószínűsítik a kloroplasztisz sztróma folyadékában, vagy a kloroplasztisz határhártyában.



24. ábra Az sztrómafolyadék + kloroplasztisz határhártya preparátum redukált - oxidált differencia spektruma. (A) a redukált minta 1 mM aszkorbátot és 10 μ M PMS-t, az oxidált minta 1 mM H₂O₂-tartalmazott. (B) Mindkét minta redukált (1 mM aszkorbát, 10 μ M PMS), az egyik mintán 2 percen keresztül CO-ot buborékolattunk keresztül.

A terminális oxidáz biokémiai módszerekkel történő azonosítása jelenleg folyamatban van. Elkezdtük a kloroplasztisz határhártya vastartalmú fehérjéinek meghatározását, továbbá a feltételezett terminális oxidáz oszlopkromatográfiás

dúsítását. Kísérleteket folytatunk az antitesttel történő azonosításra is.

5.6. A klororespiráció fiziológiai szerepe

Az eddig bemutatott kísérletek mind a klororespiráció létének bizonyítására és a fotoszintézissel való kölcsönhatására vonatkoztak. Ezeken túlmenően fontos kérdés annak tisztázása, hogy a klororespiráció jelenléte a kloroplasztisban csupán a törzsfejlődés során fennmaradt csökevény, vagy tényleges élettani jelentőséggel bír.

Egy korábbi kísérlet (80) azt mutatta, hogy 3% cukortartalmú táptalajon a növények növekedése DCMU-val nem volt gátolható. Annak eldöntésére, hogy elegendő rendelkezésre álló cukor esetén a növény ki sem fejleszti a fotoszintetikus elektrontranszport lánc komponenseit, vagy csak az elektrontranszport működését állítja le, elkezdjük vizsgálni, hogy van-e különbség a különböző cukorkoncentrációjú táptalajon nevelt növények fotoszintetikus egységei között. Ezért összehasonlítottuk az üvegházi kontroll, 0,3%-os és 3%-os cukron nevelt növény kloroplasztiszainak egyes alkotóit és aktivitásait (1. táblázat).

A kísérletek jelenleg is folynak. Előzetes eredményként azonban megállapíthatjuk, hogy nincs jelentős különbség a három, különböző cukortartalmú táptalajon nevelt növény fotoszintetikus egységei között.

	Üvegházi kontroll	0,3 % cukor	3 % cukor
KI a / KI b	2,53	2,43	2,7
[KI]/[P700]	1065	950	1051
e ⁻ transzport seb. +NH ₄ Cl H ₂ O → DCPIP -NH ₄ Cl	100 % 100 %	192 % 192 %	102 % 123 %
e ⁻ transzport seb. +NH ₄ Cl H ₂ O → Ferriclanid -NH ₄ Cl	100 % 100 %	284 % 351 %	264 % 318 %
Az oxidált klonakceptorok mennyisége elektronkv./reakciócentrum	4,5	3,72	2,16

1. táblázat A különböző cukorkoncentrációjú táptalajon nevelt dohány fotoszintetikus alkotóinak vizsgálata. A méréseket izolált kloroplasztiszból, ozmotikus feltöréssel készített tilakoid membránokon végeztem, spektroszkópiás módszerekkel.

Annyi bizonyos, hogy a magas cukorkoncentráción nevelt növények is kifejlesztik a fotoszintetikus rendszereiket, azonban sejtkörnyezetükben ezek mégsem működnek. Feltételezhető, hogy a fotoszintézis erős légzéskontroll alatt áll. Fluoreszcencia indukciós adataink mutatják, hogy a cukron nevelt növényekben a plasztokinon molekulák redukált állapotban vannak, míg az üvegházi kontrollban a plasztokinon molekulák jelentős hányada található oxidált állapotban. Ha a plasztokinon molekulák redukáltak, ez megmagyarázza azt a megfigyelést, hogy a növények érzéketlenek a DCMU-ra, hiszen ebben az esetben a PSII nem képes a töltésszétválasztásra. Ha izoláljuk a tilakoid membránokat, megszűnik a fotoszintézis légzéskontrollja (és/vagy klororespiráció kontrollja) és a fotoszintetikus elektrontranszport lánc intenzíven működni kezd.

Ez az összehasonlító kísérlet felvetette azt a gondolatot, hogy a növények bizonyos körülmények között leállíthatják fotoszintézisüket.

Annak reményében, hogy a légzés és a fotoszintézis kapcsolata változik a növekedés folyamán, összehasonlítottuk a különböző életkorú levelek oxigénfelvételét, oxigénfejlesztését és fluoreszcencia indukcióját. Az eredményeket az 2. táblázatban foglaltuk össze.

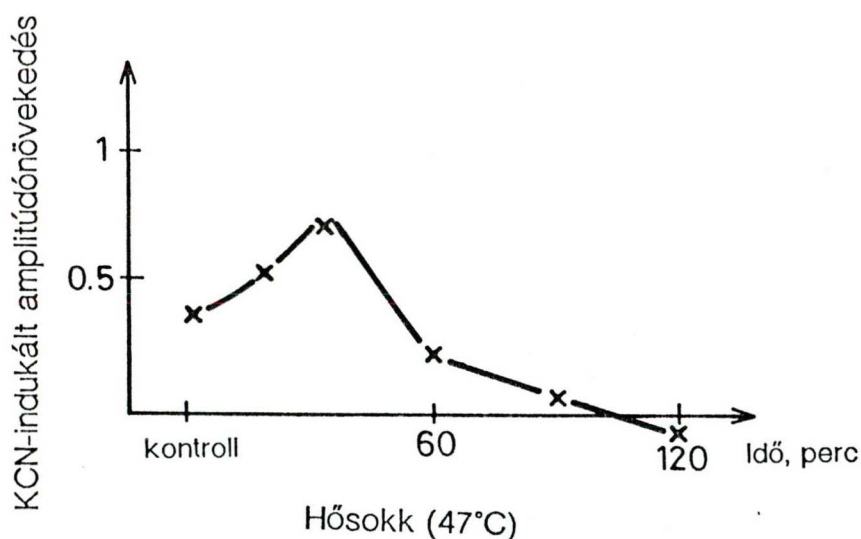
	O ₂ -felvétel $\mu\text{M O}_2\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$	O ₂ -fejlesztés $\mu\text{M O}_2\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Az O ₂ -fejlesztés "lag"-fázisa 1. 3. gerjesztés		$f = \frac{F_m - F_t}{F_m - F_0}$
<u>cukorrépa</u>					
fiatal	3,4	5,4	146	13	0,02
közepes	2,9	6,1	53	8	0,28
fejlett	1,2	3,6	11	7	0,77
<u>dohány</u>					
fiatal	3,8	4,0	28	7	0
közepes	1,4	4,2	9	3	0,26
fejlett	0,6	2,7	9	4	0,49

2. táblázat A levelek oxigén-kicserélődési és klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterei. Az oxigén-felvétel ill. fejlesztés értékeit 5 perc sötét adaptáció után mértük. A fluoreszcencia indukciót 2000 lux-on adaptált növények leveleiben mértük, a levéldarabokat a mérés előtt 30 s-ig sötétben tartottuk. F_0 és F_t az 1. gerjesztési intervallum kezdeti és végső relatív fluoreszcencia intenzitásai. F_m maximális fluoreszcencia intenzitás 15 perc sötét adaptáció után. A fiatal levelek az első két-három legfiatalabb, a közepes a következő két-három legfiatalabb levelek.

Az 1. oszlopból kitűnik, hogy a fiatal levelek légzése a legintenzívebb. Ezzel szemben, mint ahogy a 3. oszlop mutatja, kezdetben nincs oxigén fejlesztés. Ismételt,

fehér fénnel történő gerjesztés hatására azonban a fiatal levelek fotoszintézise beindul, és hasonlóvá válik az összes mintában (2. és 4. oszlop).

Ezen folyamatok léte nem bizonyítja, de erősen valószínűsíti a fotoszintézis légzéskontrolljának különösen erős voltát fiatal leveleken. A fluoreszcenciás adatok alátámasztják ezt a feltevést. Az f paraméter értéke, amely a fluoreszcencia indukciós görbéből számítható (5. oszlop), egyenesen arányos a teljes elektrontranszport lánc teljesítőképességével (81). Az f értéke kicsi a fiatal levelekben, ahol a légzés intenzívebb és magas a kifejlett levelekben, ahol az oxigénfogyasztás sokkal alacsonyabb.



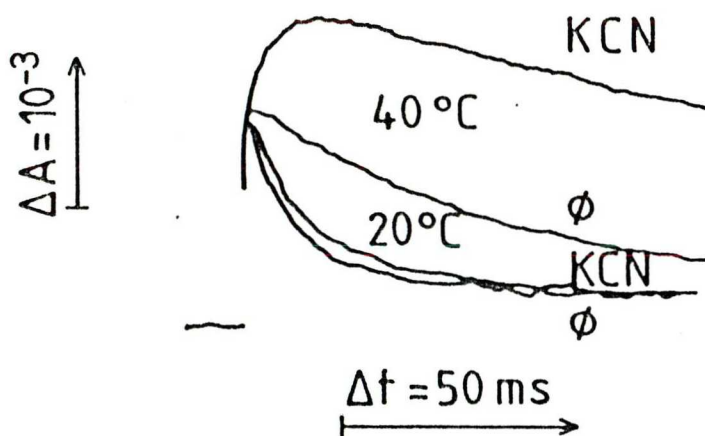
25. ábra Az *Anacystis nidulans* KCN-indukált citokróm f aktivitásnövekedése a hőkezelés idejének függvényében. A hőkezelést 47 °C-on végeztük, különböző ideig.

A kísérleteinknek ebben a szakaszában feltételeztük azt is, hogy a

klororespirációs útnak szélsőséges környezeti viszonyok között van szerepe. Ilyen szélsőséges környezeti tényező lehet az alacsony és magas hőmérséklet is.

Ezért megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását a klororespirációra protoplasztiszokban és zöld algákban, továbbá a légzés és a fotoszintézis kapcsolatára gyakorolt hatását cianobaktériumok esetében. A 25. ábra mutatja, hogy a hőkezelés idejétől függően a légzési és a fotoszintetikus út aktivitása széles határok között változik.

Chlamydomonas esetében, mint ahogy a 26. ábrán látható, szobahőmérsékleten nem mérhető számottevő klororespirációs aktivitás. 35 és 45°C között azonban a klororespirációs út aktivitása jelentős mértékben megnőtt.



26. ábra A hőmérséklet hatása a *Chlamydomonas reinhardtii* ΔA_{515} kinetikájára, 2 mM KCN jelenlétében és hiányában.

Protoplasztiszok esetében a várttal ellentétben nem tapasztaltunk változást a klororespiráció aktivitásában a vizsgált hőmérsékleti tartományban (17-40 °C).

Gátlók hatásának tanúsága szerint a hőmérséklet emelésével azért nem befolyásolható a klororespiráció aktivitása protoplasztiszokban, mert az már szobahőmérsékleten is magas volt.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A munkánk megkezdésekor legfontosabb kérdés az volt kimutatható-e a klororespiráció a magasabb rendű növényekben. Ugyan egysejtű algák kloroplasztiszaiban kimutatták a klororespirációt, de kérdéses volt, vajon ez csupán a törzsfajlás során fennmaradt csökevény vagy fontos fiziológiai szerepe van. A klororespiráció működése magasabb rendű növényekben tehát nem volt magától értetődő. A kimutatása érdekében kézenfekvőnek látszott a légzésgátlók (KCN, CO, Na₂S) hatásának vizsgálata a kloroplasztisz fotokémiai folyamataira.

A kísérleteket kezdetben protoplasztiszokon végeztük. A 7. és 8. ábrán látható, hogy a légzésgátlók hozzáadásával a citokróom b₆/f komplex aktivitása jelentősen megnőtt.

Ez a megfigyelés még nem bizonyította minden kétséget kizáróan a klororespiráció meglétét, hiszen elképzelhető volt az is, hogy csupán a mitokondriális légzés szabályozó szerepe érvényesül. *Chlorellá*-ban Laverne azt találta, hogy a fotoszintézis termelte oxigént a mitokondrium is felhasználja, mielőtt az kidiffundálna a sejtől. Szerinte összetapadhat a kloroplasztisz és a mitokondrium azért, hogy reciklizálódhasson a fotoszintetikus oxigén (82). Ahhoz, hogy a mitokondrium szerepét kizárhassuk feltétlenül szükséges volt a kísérleteket intakt kloroplasztiszokban is

elvégezni. Az "open-cell" preparátumokban és az izolált kloroplasztiszokban minőségileg hasonló eredményeket kaptunk, mint protoplasztiszok esetén (11., 12. ábra). A kloroplasztisz izolálás folyamán a mitokondriumokat eltávolítottuk, tehát a mitokondrium hatása a kloroplasztiszokra kizárható. Egy további bizonyíték a más irányú (nem mitokondriális) regulációra az a megfigyelésünk, miszerint a citokróm b_6/f komplex aktivitása már egyetlen villanófény-gerjesztés hatására is megnő (13. ábra). Természetesen ez nem jelenti azt, hogy nincs kölcsönhatás a mitokondrium és a kloroplasztisz között, de az általunk kapott eredmények a fotoszintézis más úton történő szabályozását mutatják.

Izolált kloroplasztiszokban, protoplasztiszokban és levelekben kimutattuk, hogy a légzésgátlók megnövelik a citokróm b_6/f komplex aktivitását. Ez az aktivitásnövekedés kimutatható a ΔA_{515} lassúfázisának kinetikájából (amely a citokróm f elektrogén aktivitásából adódik) és a citokróm b_6/f komplex villanófény-indukált abszorpciós tranzienséből (7., 10. és 16. ábra).

A "tartalék" PSI reakciócentrumok újraaktiválása (13. és 15. ábra) összhangban van a citokróm b_6/f komplex aktivitásának növekedésével. Légzésgátlók hiányában a citokróm b_6/f komplex felől a PSI reakciócentrum felé áramló elektronok a reakciócentrumok egy részét képesek csak újra redukálni. A többi reakciócentrum oxidált állapotban marad. (Ennek oka nem magyarázható a plasztokinon molekulák kisebb redukáltsági fokával, hiszen ha ditionit hozzáadásával az összes plasztokinon

molekulát redukáltuk, továbbra is nagyszámú, inaktív reakciócentrumot tudtunk kimutatni (15. ábra)). Ezeket a reakciócentrumokat az alternatív reakcióút (klororespiráció) gátlásával újra lehet aktiválni. Ezek a kísérletek mind jól értelmezhetők azzal, hogy a fotoszintézis és a klororespiráció két egymással versengő folyamat. Hasonló szabályozó mechanizmust (a légzés és a fotoszintézis versengését az elektronokért) mutattak ki fotoszintetikus baktériumokban (83) és heterocisztákban (44).

Az irodalomból tudjuk, hogy a citokróm b_6/f komplex a bíbor, nem-kén baktériumokban és cianobaktériumokban a légzési és a fotoszintetikus elektrontranszport lánc közös komponense (34, 35). A kísérleteinkből nem tudjuk egyértelműen eldönteni, vajon a citokróm b_6/f komplex tagja-e a klororespirációs láncnak. A ΔA_{515} KCN-indukált abszorpciönövekedéséből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a két elektrontranszport lánc elágazási helye a citokróm b_6/f komplex előtt található. A lehetséges elágazási pontot a plasztokinon molekulák és a citokróm b_6/f komplex környékén kell keresni.

Feltételezésünk szerint az elágazási helytől az elektronok két irányban mehetnek tovább. Az egyik irány a már jól ismert fotoszintetikus út, a másik a klororespirációs út.

Cianobaktériumokban a légzés és a fotoszintézis szoros kapcsolatban áll egymással, olyannyira, hogy közös komponenseik is vannak. A légzési láncuk NADH-

dehidrogenázt, plasztokinon molekulákat, citokróm b_6/f komplexet, citokróm c_{553} -at és egy citokróm aa_3 -típusú terminális oxidázt tartalmaz.

A cianobaktériumok légzési komponenseinek ismeretében megpróbálom összefoglalni azokat az ismereteket, amelyekkel a klororespiráció tagjairól rendelkezünk.

A klororespirációs aktivitás kimutatása után felmerült a kérdés, hogy hol található, és hogyan azonosítható ennek a speciális légzésfajtának a terminális oxidáza. A protoplasztiszok, intakt kloroplasztiszok és a tilakoid membránok összehasonlításakor kiderült, hogy a terminális oxidáz helye a határhártyával burkolt kloroplasztiszokban a legvalószínűbb. A tilakoid membránban a kompetíció alapján a klororespiráció már nem mutatható ki. A terminális oxidáz elhelyezkedésére két lehetőség van. Vagy a sztróma folyadékban található, vagy a kloroplasztisz határhártyájában. Ezt kísérletünkkel is alátámasztottuk (24. ábra). A szétkapcsolókkal végzett kísérletek (21. ábra) azt valószínűsítik, hogy a terminális oxidáz membránkötött, és helye a határhártyában van.

A terminális oxidáz lokalizációja még cianobaktériumokban sem egyértelmű. A kimutatását nagymértékben nehezíti, hogy a terminális oxidáz koncentrációja különböző körülmények között nagymértékben változik. Sokáig vitatott volt, hogy helye a tilakoid membránban, vagy a sejtmembránban van-e. Az is kérdés, hogy van-e fiziológiai szerepe a klororespirációnak, és hogy mennyire hasonlít az ősi típusú

légzési láncokhoz. Ezek alapján nem tudjuk, hogy a terminális oxidáz pontosan hol helyezkedik el, és milyen típusú komplexet kell keresni. Feltételeztük, hogy egy vastartalmú aa₃-típusú citokrómról van szó. Mivel ugyanazt a típusú kompetíciót ki tudjuk mutatni, mint cianobaktériumok esetében, ezért a terminális oxidázt megpróbáltuk ugyanazokkal a módszerekkel azonosítani, mint azt a cianobaktériumokban esetében tették.

Eddigi kísérleteinkből tudjuk, hogy a klororespiráció terminális oxidáza cianid és szulfid-érzékeny. Spektroszkópai módszerekkel ki tudtunk mutatni egy aa₃-típusú citokrómra jellemző abszorpciós maximumot, továbbá kimutattuk, hogy a terminális oxidáz CO kötőhellyel is rendelkezik. Ezek az adatok mind arra utalnak, hogy a klororespiráció terminális oxidáza, hasonlóan a cianobakteriális és mitokondriális légzéshez, egy aa₃-típusú citokróm. Ezt azonban teljes biztonsággal kijelenteni még korai lenne. Feltétlenül szükséges a terminális oxidáz biokémiai módszerekkel történő azonosítása. Laboratóriumunkban jelenleg folyamatban vannak ezek a kísérletek.

Cianobaktériumokban a citokróm b₆/f komplex a légzési lánc tagja. A citokróm b/c komplex érzékeny antimycinre és mixothyazolra. A kloroplasztiszban is találtak antimycin és mixothyazol érzékeny komponenst. Ezt a komponenst még nem azonosították, de tudják róla, hogy a plasztokinon molekulák után található, hiszen a fotoszintetikus elektrontranszport nem érzékeny az antimycin A-ra és a mixothyazolra (84). Továbbá számos adat utal arra is, hogy a citokróm b₆/f érzéketlen

ezekre a mitokondriális légzésgátlókra (85-87). A klororespiráció ezen komponense valószínűleg a PSI fotoredukciós folyamataiban is szerepet játszik.

A terminális oxidáz donoráról még keveset tudunk. A tilakoid membránban nemrég felfedezett citokróm b_{560} azonban egy lehetséges jelölt a klororespirációs elektrontranszport láncban (88).

Adataink a fentebb leírtakkal összhangban azt mutatják, hogy a klororespiráció elágazása valószínűleg a citokróm b_6/f komplex előtt, és a plasztokinon molekulák után található.

A fotoszintézis és a klororespiráció egyetlen közös komponense a plasztokinon molekula. Diner és Mauzerell korai megfigyelése volt (54), hogy a plasztokinon molekulák nem csak a fotoszintetikus láncból képesek redukálódni. Kísérleteinkből mi is hasonló következtetésre jutottunk.

Összehasonlítva a 7. és a 11. ábrát nem csak a fotoszintézis légzéskontrollját láthatjuk a sejtkörnyezetében és az onnan kiszakított kloroplasztiszokban, hanem észre kell venni a különbséget is. A ΔA_{515} relatív amplitudók DCMU jelenlétében lényegesen eltérnek egymástól. Protoplasztiszok esetében az ismétlődő gerjesztés hatására az aktív, töltésszétválasztásra képes reakciócentrumok koncentrációja 30 és 60% között mozog, míg az ugyanebből a protoplasztiszból izolált kloroplasztiszok esetében 10 % alatt marad. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a plasztokinon molekulák nem csak fotokémiai úton képesek redukálódni. Létezni kell tehát egy

állandó redukálóerő áramlásnak a citoszol felől a plasztokinon molekulák felé. *Chlamydomonas*-ban ezek az elektronok a keményítő lebontásából származnak (89). Tudjuk, hogy magasabb rendű növényekben a keményítő-lebontás egyértelműen a kloroplasztiszban van. Ezzel nem magyarázható a citoszol szerepe a klororespirációban. Nagyon valószínű, hogy a mitokondrium és a kloroplasztisz között létezik egy transzport folyamat, melynek során az elektrondonáláshoz szükséges anyagok jutnak be a kloroplasztiszba. A mitokondrium légzési láncában található NADH-dehidrogenáz 7 *ndh* alegységének homológját megtalálták a kloroplasztiszban is (60). Stern (90) magasabb rendű növényekben kimutatta a NADH-dehidrogenázt kódoló DNS transzpozícióját a kloroplasztisz és a mitokondrium között. Ezek alapján valószínű, hogy a citoszol a NADP- és NADPH-dehidrogenázon keresztül érvényesíti hatását.

Bennoun zöld algákban kimutatta (62), hogy az alternatív légzést gátló SHAM növeli a plasztokinonok redukáltsági állapotát. Magasabb rendű növényekben mi is hasonló jelenséget találtunk (9. ábra). Azt is tudjuk, hogy a redukáltsági fok nagymértékben függ a sejt ATP tartalmától (91).

Érdekes megvizsgálni a plasztokinon molekulák lehetséges donorait. Prokariótákban a NADH-dehidrogenáz redukálja őket. Kloroplasztiszokban is kimutatták a NADH-dehidrogenáz jelenlétét és magas koncentrációban szukcinát-dehidrogenázt is találtak. Mind a NADH, mind a szukcinát lehetséges donora a

plasztokinonoknak. Az utóbbi időkben egyre több jel mutat a NADPH lehetséges szerepére is. A NADPH koncentrációtól nagymértékben függ a fotoszintetikus elektrontranszport lánc komponenseinek redukáltsági állapota (91-93).

A plasztokinon molekulák nem fotoszintetikus úton történő redukciója szoros összefüggésben van a mitokondriális légzéssel is. Ha az oxidatív foszforilációt oligomycinnel gátolták (94) a sejt ATP koncentrációjával arányosan a fotoszintézis is gátlódott. A mitokondriális légzés és a fotoszintézis közötti kapcsolatot a NADH, NADPH, ATP és ADP biztosítja (95).

Az eddig felsoroltakból úgy tűnik, hogy a klororespiráció betáplálási oldala erősen mitokondrium függő.

Prokariótákban a légzési elektrontranszport láncnak a fotoszintetikus elektrontranszporthoz történő kapcsolódásának szükségességére logikus magyarázat, hogy a két funkció együttes jelenléte sokkal rugalmasabbá teszi a sejteket a környezeti tényezők káros hatásaival szemben, továbbá lehetővé teszi a légzés fényregulációját is. Ez a magyarázat prokarióta sejtek esetében kielégítő.

Eukarióta sejtekben Bennoun szerint (62) a klororespiráció biztosítja a NADPH reciklizációját a glikolízis hatására bekövetkező keményítő lebontás folyamán. Ennek az eljárásnak első lépésében a 3-glükoz 6-foszfát 3-glükonát 6 foszfáttá alakul, amely lépés NADPH-függő. A NADPH reoxidációja a glikolízis alatt fontos lehet a folyamat sötétben történő szabályozásában. Egy másik lehetséges funkciója

a klororespirációnak a hatékony elektrokémiai gradiens fenntartásával (felemeli ill. a küszöbpotenciálhoz közeli értéken tartja a $\Delta\psi$ -t) az ATP-áz aktív formában történő megőrzése egy hosszabb sötét periódus után is (96). A klororespiráció kontrollálhatja a fotoszintetikus apparátus funkcionális szerveződését: alacsony ATP szintnél (pl. anaerob körülmények, hosszú éheztetés) képes a ciklikus elektrontranszporton keresztül (amely fényen az ATP-szintézishez kapcsolt) a fénybegyűjtő komplexek foszforilációját elősegíteni (State I $\rightarrow$ State II átmenet). Magas ATP szint esetén a klororespiráció szerepe csökken, mert az ATP képes a szukcinát-dehidrogenáz vagy a NADPH/plasztokinon-oxidoreduktázon keresztül a plasztokinon molekulákat redukálni (91,93).

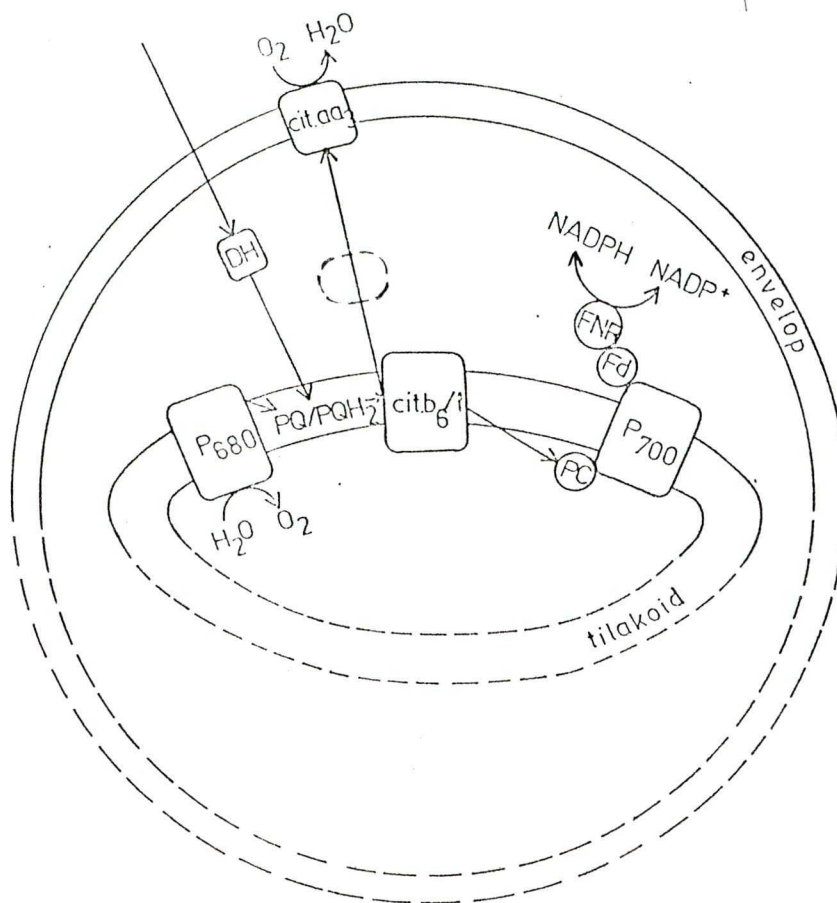
A legvalószínűbb, hogy a sejtek a klororespirációt leghatékonyabban az extrém körülmények között használják. A klororespiráció fiziológiai szerepének sok magyarázata közül még egyik sem meggyőző, azonban az eddigi adatok arra utalnak, hogy a kloroplasztiszban jelenlévő légzési lánc, vagy a légzési lánc egy darabja nem a törzsfejlődés során fennmaradt csökevény, hanem fontos szabályozó és védő mechanizmus.

A dolgozatomban a cianid-gátlás hatásának vizsgálata központi szerepet játszik. A sejtekben a cianidnak több hatóhelye ismert. Ezeket a hatóhelyeket a hatásos koncentrációk alapján élesen elkülöníthetjük egymástól (17. ábra). A SOD gátlásának vizsgálata során (97) felmerült az a lehetőség, hogy esetleg a SOD a

klororespiráció terminális oxidáza. Ennek lehetőségét azonban az enzim gátlásához szükséges cianidkoncentráció alapján kizártuk. A mitokondrium szerepét is kizárhatjuk, ugyanis a mitokondrium és a klororespiráció gátlásához szükséges cianidkoncentráció közel egy nagyságrenddel eltér egymástól.

Fontos a kloroplasztiszban működő légzési lánc, vagy lánc darab elkülönítése a Mehler reakciótól. A két oxigénnel történő kölcsönhatás különbözőségére a döntő bizonyítékot Bennoun PSI mutáns zöld algákon végzett kísérlete szolgáltatta (62). Mivel a Mehler reakció tipikusan PSI reakció, ezért a PSI hiányos zöld algákon kimutatott klororespiráció nem lehet azonos a Mehler reakcióval. Ezen túlmenően a különbséget számos tényező támasztja alá: (i) az oxigén redukciója a PSI akceptor oldalán fényfüggő reakció (98). Ezzel ellentétben a lassúfázis KCN-indukált serkentése sötétben kezelt protoplasztiszokon, néhány fényfelvillanás után is megfigyelhető. (ii) A KCN-indukált növekedés DCMU jelenlétében is megfigyelhető, amely gátolja az oxigén fotoredukcióját (99). (iii) Adataink azt mutatják, hogy a légzési kölcsönhatás a PSI donor oldalán található, nem az akceptor oldalon.

A rendelkezésünkre álló adatok alapján felállított hipotézisünket a magasabb rendű növények fotoszintetikus és klororespirációs elektrontranszportjának kölcsönhatására, az 27. ábrán foglaltuk össze.



27. ábra A klororespirációs és a fotoszintetikus elektrontranszport funkcionális kölcsönhatása magasabb rendű növényekben. P680, P700 a PSI és a PSII reakciócentrumai; PQ/PQH₂, oxidált és redukált plasztokion; Cit., citokróm; PC, plasztocianin; DH, dehidrogenáz; Fd, ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz.

Adataink azt mutatják, hogy a magasabb rendű növények klororespirációja nagyfokú hasonlóságot mutat a cianobaktériumok légzésével és a zöld algák klororespirációjával. Fontos szempont volt tehát a kísérleteink során az eredmények összehasonlítása a cianobaktériumokban és zöld algákban kapott eredményekkel. Adataink jól szemléltetik a közeli rokonságot a különböző fejlettségi fokon lévő

szervezetekben. Cianobaktériumokban, zöld algákban és magasabb rendű növényekben kimutattuk a légzés és a fotoszintézis versengését. Nagy valószínűséggel a cianobaktériumok légzésének, a zöld algák és a magasabb rendű növények klororespirációjának terminális oxidáza egy citokróm aa₃.

A nagyfokú hasonlóságon túl, eltéréseket is tapasztaltunk. *Anacystis* és *Chlamydomonas* esetében a légzési és a klororespirációs út aktivitása széles tartományban ingadozik. Az aktivitását nagymértékben befolyásolja a populáció életkora és a környezeti tényezők. Magasabb rendű növényekben nem tudtunk kimutatni ilyen nagyfokú függést sem az életkortól, sem a környezeti tényezőktől. Azt tapasztaltuk, hogy magasabb rendű növények protoplasztiszaiban a klororespirációs út már normál körülmények között is aktív. Ennek lehetséges oka az izolálást követő stresszhatás, amely aktiválni képes az alternatív elektrontranszportot.



7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkkel kimutattuk a klororespiráció létét a magasabb rendű növényekben (100). Bebizonyítottuk, hogy a fotoszintézis légzéskontrollja nagyfokú hasonlóságot mutat a fotoszintetikus baktériumokban, cianobaktériumokban és a zöld algákban működő légzéskontrollhoz. Spektroszkópiai módszerekkel nyert adataink azt valószínűsítik, hogy a klororespiráció terminális oxidáza aa₃-típusú citokróm. Meghatároztuk a fotoszintetikus és klororespirációs elektrontranszport elágazási helyét. Kimutattuk, hogy a klororespirációs útnak főként szélsőséges környezeti tényezők esetén van jelentősége.

IRODALOM

1. Kamen, M.D. (1963) Primary Process in Photosynthesis, Acad Press, New York.
2. Mitchell, P. (1974) FEBS Lett. 43, 189-194.
3. Hayes, J.M., Kaplan, I.R., Wedeking, K.W. (1983) Earth's Earliest Biosphere; its Origin and Evolution (szerk.: Schopf, J.W.) Princeton University Press, Princeton 93-134.
4. Schopf, J.W., Walter, M.R. (1983) ugyanott, 2214-239.
5. Walker, J.C.G., Klein, C., Schidlowski, M., Schopf, J.W., Stevenson, D., Walter, M.R. (1983) ugyanott, 260-290.
6. Segal, L. (1967) J. Theoret. Biol. 14, 225.
7. Magrum, L.J., Luehrsens, K., Woese, C.R. (1978) J. Mol. Evol. 11, 1-8.
8. Woese, C.R., Fox, G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090.
9. Pfennig, N. (1978) The Photosynthetic Bacteria (szerk.: Clayton, R.K. and Sistrom, W.R.) Plenum, New York, 3-18.
10. Danon, A., Stoeckenius, W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1234-1238.
11. Oesterhelt, D., Krippahl, G. (1983) Ann. Microbiol. (Paris) 134B, 137-150.
12. Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M., Matheson, A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5948-5952.
13. Lake, J.A. (1983) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 30, 163-194.
14. Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M., Oakes, M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3786-3790.
15. Sironval, C. (1971) Molecular Evolution 2, Biochemical Evolution and the Origin of Life (szerk.: Schoffeniels, E.) North-Holland Publishing Company-Amsterdam, London, 236-259.

16. Packham, N.K., Barber, J. (1987) *The Light Reactions* (szerk.: Barber, J.) Elsevier Science Publishers (Biomedical Division), Amsterdam, New York, Oxford, 1-30.
17. Gray, M.W., Doolittle, W.F. (1982) *Microbiol. Rev.* 46, 1-42.
18. Bogorad, L. (1975) *Science* 188, 891-898.
19. Raff, R.A., Mahler, H.R. (1975) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29, 41-92.
20. Cavalier-Smith, T. (1975) *Nature, (London)* 256, 463-468.
21. Keyhani, E. (1981) *Ann. NY. Acad. Sci.* 361, 376-396.
22. Reijnders, I. (1975) *J. Mol. Evol.* 5, 167-176.
23. Uzzel, T., Spolsky, C. (1974) *Am. Sci.* 62, 334-343..
24. Woese, C.R. (1977) *J. Mol. Evol.* 10, 93-96.
25. Cavalier-Smith, T. (1987) *Ann. NY. Acad. Sci.* 503, 55-71.
26. Raven. P.H. (1970) *Science*, 169, 641-646.
27. Nitschke, W., Rutherford, A.W. (1991) *TIBS*, közlés alatt.
28. Baccarini Melandri, A., Zannoni, D. (1978) *J. Bioenerg. Biomembranes* 10, 109-138.
29. Van Niel, C.B. (1941) *Adv. Enzymol.* 1, 263-328.
30. Nakamura, H. (1937) *I. Acta Phytochim.* 9, 189-234.
31. McCarthy, J.E.G., Ferguson, S.J. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1406-1411.
32. Cotton, N.P., Clark, A.J., Jackson, J.B. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 581-587.
33. Richaud, P., Marrs, B.L., Vermeiglio, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 850, 256-263.

34. Venturoli, G., Fenoll, C., Zannoni, D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 892, 172-184.
35. Scherer, S., Almon, H., Böger, P. (1988) *Photosynth. Res.* 15, 95-114.
36. Peschek, G.A. (1987) *The Cyanobacteria* (szerk.: Fay, P. and Van Baalen, G.) Elsevier, North Holland 119-162.
37. Molitor, V., Peschek, G. (1986) *FEBS Letters*, 195, 145-150.
38. Matthijs, H.C.P., Luderus E.M.E., Löffler, H.J.M., Scholts, M.J.C., Kraayenhof R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 766, 29-37.
39. Binder, A., Hauser, R., Krogmann, D. (1984) *Energy Coupling in Photosynthesis* (szerk.: Selman, B.R. and Selman-Reimer, S.) Elsevier, North Holland, New York, 313-321.
40. Hirano, M., Satoh, K., Katoh, S. (1980) *Photosynth. Res.* 1, 149-162.
41. Lockau, W. (1981) *Arch. Microbiol.* 128, 336-340.
42. Binder, A. (1982) *Journal of Bioenerg. and Biomembr.*, 14, 271-286.
43. Scherer, S., Alpes, I., Sadowski, H., Böger, P. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 288-335.
44. Houchins, J.P., Hind, G. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 272-282
45. Lampe, H.H., Drews, G. (1972) *Arch. Microbiol.* 84, 1-19.
46. Peschek, G.A. (1983) *Biochem. J.* 210, 269-272.
47. Gaffron, H., Rubin, J. (1942) *Am. J. Bot.* 27, 273-283.
48. Gfeller, R.P., Gibbs, M. (1984) *Plant. Physiol.* 75, 212-218.
49. Healey, F.P. (1970) *Planta*, 91, 220-226.
50. Healey, F.P. (1970) *Plant. Physiol.* 45, 153-159.

51. Stuart, G.S., Gaffron, H. 1971) *Planta*, 100, 228-243.
52. Gibbs, M., Gfeller, R.P., Chen C. (1986) *Plant. Physiol.* 82, 160-166.
53. Gfeller, R.P., Gibbs, M. (1985) *Am. J. Bot.* 77, 509-515.
54. Diner, B.A., Mauzerall, D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305, 329-352.
55. Ben-Amotz, A., Gibbs, M. (1975) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 64, 355-359.
56. Godde, D., Trebst, A. 1980) *Arch. Microbiol.* 127, 245-252.
57. Peltier, G., Thibault, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 936, 319-324.
58. Knaff, D.B. (1978) *The Photosynthetic Bacteria* (szerk.: Clayton, R.K. and Sistrom, W.R.) Plenum Press, New York and London, 629-638.
59. Willeford, K.O., Gombos, Z., Gibbs, M. (1989) *Plant. Physiol.* 90, 1084-1087.
60. Umesono, K., Ozeki, H. (1987) *Trends. Genet.* 3, 281-287.
61. Fearnley, I.M., Runswick, M., Walker, J.E. (1989) *EMBO J.* 8, 665-672.
62. Bennoun, P. (1982) *Proc. Nat. cad. Sci. USA* 79, 4352-4356.
63. Wilhelm, C., Duval, J.C. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1016, 197-202.
64. Allen, M.M. (1968) *J. Phycol.* 4, 1-4.
65. Gorman, D.S., Levine, R.P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 54, 1665-1669.
66. Márton, L. (1984) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1: Laboratory Procedures and Their Applications, (szerk.: Vasil, I.K.) Academic Press, New York, 514-521.
67. Kao, K.N., Constabel, N.F., Michayluk, M.R., Gamborg, O.L. (1974) *Planta*, 120, 215-227.
68. Nakatani, H.Y., Barber, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 461, 510-512.

69. Lilley, R. McC., Fitzgerald, M.P., Rienits, K.G., Walker, D.A. (1975) *New Phytol.*, 75, 1.
70. Douce, R., Joyard, J. (1980) *Methods in Enzymology* 69, 290-301.
71. Arnon, D.I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1.
72. Junge, W. (1977) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28, 503-536.
73. Lavorel, J., Etienne, A.J. (1977) *Primary Processes of Photosynthesis* (szerk.: Barber, J.) Elsevier, Amsterdam, 203-268.
74. Delieu, T.J., Walker, D.A. (1983) *Plant. Physiol.* 73. 534-541.
75. Junge, W., Jackson, J.B. (1982) *Photosynthesis I, Energy conversion by plants and bacteria* (szerk.: Govindjee) Academic Press New York, 590-639.
76. Cramer, W.A., Black, M.T., Widger, W.R., Girvin, M.E. (1987) *Photosynthesis* 8, 447-493
77. Azcón-Bieto, J., Ribas-Carbó, M., González-Meler, M.A., Penuelas, J. (1989) *Plant Physiol.* 90, 1249-1251.
78. Matsuura, K., Murakami, A., Fujita, Y. (1988) *Plant Cell Physiol.*, 29, 1261-1268.
79. Izawa, S. (1977) *Encyclopedia of plant physiology N.S.*, 5, *Photosynthesis I* (szerk.: Trebst, A., Avron, M.) Springer, Berlin Heidelberg New York, 266-282.
80. Cséplő, Á., Medgyesy, P. (1986) *Planta*, 168, 24-28.
81. Malkin, S. (1987) *Planta* 171, 65-72
82. Lavergne, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8768-8772.
83. Vermeglio, A., Joliot, P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 764, 226-232.
84. Ravenel, J., Peltier, G. (1991) *Photosynthesis Research*, közlés alatt.
85. Wood, P.M., Bendall, D.S. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 337-344.

86. Bendall, D.S. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683, 119-151.
87. Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N., Lockau, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 97-137.
88. Rolfe, S.A., Sanguanserm, M., Bendall, D.S. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 894, 434-442.
89. Gfeller, R.P., Gibbs, M. (1985) *Plant Physiol.* 77, 509-511.
90. Stern, D.B. (1987) *J. Cell Sci.* 7, 145-154.
91. Bulté, L., Gans, P., Rebeillé, F., Wollman, F-A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 72-80.
92. Rebeillé, F., Gans, P. (1988) *Plant Physiol.* 88, 973-975.
93. Stitt, M. (1982) *Plant Physiol.* 70, 971-997.
94. Krömer, S., Stitt, M., Heldt, H.W. (1988) *FEBS Lett.* 226, 352-356.
95. Gans, P., Rebeillé, F. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 109-117.
96. Sahak, Y. (1985) *J. Biol. Chim.* 260, 1459-1464.
97. Lajkó, F., Kadioglu, A., Garab, G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 696-700.
98. Badger, M.R. (1985) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 27-53.
99. Hoch, G., Owens, O.v.H., Kok, B. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 171-180.
100. Garab, G., Lajkó, F., Mustárdy, L., Márton, L. (1989) *Planta* 179, 349-358.

FÜGGELÉK

Allen médium (1 l):

NaNO ₃	1.5 g	
K ₂ HPO ₄	0,039 g	
MgSO ₄	0.075 g	
Na ₂ CO ₃	0,02 g	pH=7,0
CaCl ₂	0,034 g	
Na ₂ SiO ₃	0,058 g	
Fe-EDTA	0,1 g	
Citromsav	0,012 g	
Mikroelem oldat	1 ml	

Mikroelem oldat (1 l):

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂	1,81 g
ZnSO ₄	0,222 g
MoO ₃	0,018 g
CuSO ₄	0,079 g
Co(NO ₃) ₂	0,094 g

TAP médium (1 l):

NH ₄ Cl	0,4 g	
MgSO ₄	0,1 g	
CaCl ₂	0,05 g	
K ₂ HPO ₄	0,108 g	pH=7,0
KH ₂ PO ₄	0,056 g	
Tris	2,42 g	
Jégecet	1 ml	
Mikroelem oldat	1 ml	

Mikroelem oldat (1 l):

Na ₂ EDTA	50 g
ZnSO ₄	22 g

H ₃ BO ₄	11,4 g
MnCl ₂	5,06 g
FeSO ₄	4,99 g
CoCl ₂	1,61 g
CuSO ₄	1,57 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,1 g
KOH	16 g

K3 médium (10 l):

KNO ₃	24 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8 g
NH ₄ NO ₃	2,5 g
MgSO ₄	1,2 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g
MnSO ₄	0,068 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,023 g
Nikotinsav	0,01 g
B ₆ vitamin	0,01 g
B ₁ vitamin	0,1 g
Inozit	1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,228 g
EDTA	0,372 g
2,4 D	0,001 g
BA	0,002 g
NAA	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0024 g
KI	0,0075 g
Mikroelem oldat	20 ml

pH=6,0

Mikroelem oldat (100 ml):

CoCl ₂	1,3 mg
CuSO ₄	1,25 mg

W5 médium (1 l):

NaCl ₂	9 g	pH=5.6
Glükóz	1 g	
CaCl ₂	18,4 g	
KCl	0,4 g	

Chlorella tenyészet médiuma (2 l):

NH ₄ NO ₃	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,02 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,02 g
Peretrix oldat	2 ml

Percoll puffer (1 l)

Percoll	22 %	pH=8,0
Tris-HCl	50 mM	
Szorbit	300 mM	
EDTA	3 mM	
Merkapto-EtOH	1 mM	
BSA	0,1 %	
PEG 6000	3 % (felhasználáskor)	

MOPS puffer (1 l)

MOPS	30 mM	pH=7,2
Szorbit	300 mM	
EDTA	3 mM	
Merkapto-EtOH	8 mM	
BSA	0,2 %	

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Dudits Dénesnek, a Növényélettani Intézet igazgatójának, hogy munkám elvégzését lehetővé tette, és Dr. Garab Győzőnek, témavezetőmnek, aki a kutatási téma kiválasztásában, a kísérleti munkában és a dolgozat megírásában végig a segítségemre volt. Köszönettel tartozom Dr. Márton Lászlónak aki bevezetett a protoplasztisz izolálás rejtelseibe.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Lehoczki Endrének, Dr. Borbély Györgynek és Jakab Gábornak a munkámhoz nélkülözhetetlen algákat.

Külön köszönet illeti Dr. Mustárdy Lászlót, Tóth Zsuzsannát és Liker Erikát a munkám során nyújtott segítségükért.