József Attila Tudományegyetem

Biofizikai Tanszék

FOTOSZINTETIZÁLÓ MEMBRÁNOK FIZIKAI-KÉMIAI ÁLLAPOTÁNAK JELLEMZÉSE

Doktori értekezés

Nagy László

SZEGED

1984.

SZEGED
B 2388

1. Tartalomjegyzék

old.

1. Tartalomjegyzék ..... 2.
2. Bevezetés ..... 5.
3. Célkitüzés ..... 6.
4. Elméleti áttekintés ..... 8.
   4.1. Membránmodellek ..... 8.
   4.2. A kloroplasztisz felépitése és szerkezete ..... 12.
   4.3. Lipidek, biomembránok fázisátmenete, membránfluiditás és azt befolyásoló tényezők ..... 18.
   4.4. Fázisátmenet meghatározása a klorfill saját fluoreszcenciája alapján Chlorella pyrenoidosa és Chlamydomonas reinchardii yellow mutáns algákban. 27.
   4.5. Az 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién jellemzése, felhasználása a membránfluiditás meghatározására .. 29.
   4.6. A kisérletek során alkalmazott gátlószerek hatásának rövid jellemzése ..... 31.
5. Anyag és vizsgálati módszerek ..... 34.
   5.1. Algatenyésztés, kezelés ..... 34.
   5.2. Árpanövények nevelése, kezelése ..... 35.
   5.3. Fluoreszcenciás vizsgálatok ..... 36.
   5.3.1. Fluoreszcenciaszinképek mérése ..... 36.
   5.3.2. Fluoreszcenciaintenzitás mérése ..... 36.
   5.3.3. Fluoreszcenciapolarizációfok meghatározása és mikroviszkozitás számitása ..... 37.
   5.4. Plasztiszizolálás, inkubálás 1,6-difenil-1,3,5-hexatriénnal ..... 38.
6. Kisérleti eredmények és megvitatásuk ..... 4o.
   6.1. A nevelési hőmérséklet hatása alga kloroplasztiszmembrán fluoreszcenciatulajdonságaira ..... 4o.
   6.2. Klorofill-a in vivo fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése lipidmetabolizmust befolyásoló szerekkel kezelt algákban ..... 46.
   6.3. Klorofill-a fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése Chlamydomonas reinchardii yellow mutánsaiban ..... 52.
   6.4. Az 1,6-difenil-1,3,5,- hexatrién fluoreszkáló jelzőmolekula jellemzése és inkubálási módszerének kidolgozása ..... 54.

6.5. Zsirsavszintézist gátló szerek árpa kloroplasztiszok tilakoidmembránjára gyakorolt hatásának vizsgálata 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién fluoreszkáló jelzőmolekulával ..... 58.
7. Összefoglalás ..... 65.
8. Irodalomjegyzék ..... 67.

A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke

ANS	- 1-anilino-8-naftalin-szulfonát
AS	- anthroil-sztearinsav
ATP	- adenozin-trifoszfát
CoA	- koenzim-A
DCMU	- 3-/3;4'-diklórfenil/-1,1-dimetilurea
DGDG	- digalaktozil-diglicerid
DMPC	- dimirisztoil-foszfatidil-kolin
DNS	- dezoxi-ribonukleinsav
DPH	- 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién
DPPC	- dipalmitoil-foszfatidil-kolin
DPPE	- dipalmitoil-foszfatidil-etanol-amin
DSPC	- disztearoil-foszfatidil-kolin
GL	- galaktolipid
MA	- metronidazol /1-/2-hidroxi-etil/-2-metil-5-nitro-imidazol/
MGDG	- monogalaktozil-diglicerid
NADP	- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
Me_2DPPE	- N,N-dimetil-DPPE
NPN	- N-fenil-1-naftil-amin
OD	- optikai denzitás
PA	- fenetil-alkohol /2-fenil-etanol/
PC	- foszfatidil-kolin
PL	- foszfolipid
SAN 6706	- 4-kloro-5-/dimetilamino/-2-/α,α,α, -trifluoro-m-tolil-/-3/2H/-piridazinon
SAN 9785	- 4-kloro-5-dimetilamino/2-fenil-3/2H/-piridazinon
SAN 9789	- 4-kloro-5-metilamino/2-/α,α,α, -trifluoro-m-tolil-3/2H/-piridazinon /7-norfluorozon/

2. Bevezetés

Az utóbbi néhány évtizedben /különösen a legutóbbi tiz évben/ a biomembránok kutatása a biológia egyik központi kérdésévé vált. Nem véletlenül beszélünk ma már külön membránbiológiáról, ill. membranológiáról. Ennek köszönhető, hogy elég sokat sikerült megtudni arról a komplex molekuláris, ill. szupramolekuláris organizációról, amelyen keresztül a biomembránok funkciói megvalósulnak, bár strukturájukat illetően még ma is csak hipotézisekre szoritkozunk.

A biológiai membránok kutatásának aktualitását az adja, hogy a ma legáltalánosabb nézetek szerint a sejten belül végbemenő biokémiai és biofizikai folyamatok részben a citoplazma alapállományában, nagyrészt pedig a membránok felszinén, ill. azok belsejében játszódnak le. Az utóbbira néhány példa:

- energiavándorlás
- receptorfunkció
- hormonális integráció

/Waggoner és Stryer, 197o./

A membránok a sejten belül igen eltérőek attól függően, hogy milyen biológiai funkciót végeznek. /Quinn és Williams, 1978./ A strukturális variabilitást elsősorban a fehérje és a lipidmolekulák változása adja. A fehérje és a lipidmolekulák bonyolult lipoproteid képződményekké aggregálódnak. A szerkezet fenntartásában elsősorban nem fővegyértékkötésekre, hanem másodlagos kémiai kötésekre kell gondolnunk, amelyek kötési energiája 1-2 nagyságrenddel kisebb, mint az elsődleges kötéseké. Bár ezek az erők az egyes $-CH_2-$ csoportok között nem nagyok, számos ilyen csoport között jelentős vonzóerő alakulhatki.

Nem tisztázott még a membránban a fehérje-lipoid, valamint a lipoid-lipoid kapcsolódás. A legelfogadottabb hipotézis napjainkban a folyékony mozaik modell. E szerint az alapváz lipidkettősréteg, s ennek felszinén ill. belsejében foglalnak helyet a fehérje molekulák. Ezek a fehérjék főleg globuláris fehérjék, amelyek hidrofób részükkel a lipid kettősréteg szénhidrogén láncában, hidrofil részükkel pedig a poláris régióba ágyazódtak. Döntő többségük a membránokhoz kötött folyamatokat katalizáló enzimek.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

Meghatározó szerepet tulajdonitanak a membránok lipidösszetételének is,mind a strukturális bázis fenntartása,mind pedig bizonyos funkciók betöltése szempontjából.
A lipidek mennyiségi és minőségi eloszlása:

a, a membránhoz kötött enzimek aktivitásának feltétele
b, befolyásolja a membránpermeabilitást, a transzport funkciók irányát,sebességét,
c, receptortulajdonsággal rendelkező felszinek kialakitásában,müködésében játszik szerepet
/Sanderman,1978./

Igen kiterjedt a membránlipidek vizsgálata a struktura-funkci összefügésének tisztázása érdekében mind állati,mind mikrobiális rendszerekben./Chapman és Quinn, 1976.,Silbert,1975./Növényi szervezetekben az utóbbi időben szereztünk sok információt főleg mitokondriummembránok összetételéről/Leshem és Inbar,1977./, de egyre több az ismeretünk a kloropasztisz-membránok szerkezetéről is.Ez érthető,hiszen a fotoszintetizáló szervezetek összmembránmennyiségének kb. 9o %-át ezek a membránok alkotják,és ezek is igen sajátos lipidösszetétellel.

3.A vizsgálatok célja

a fotoszintetizáló membránok felépitésének és müködésének tanulmányozása,különös tekintettel a lipid és zsirsavak szerepére a struktura és a funkció összefüggésében.

Ismeretes,hogy a membránok lipidtartalma az élőlények növekedési hőmérsékletétől függően különböző halmazzállapotu lehet. A hidegtürő növények membránjai nagyobb mennyiségben tartalmaznak telitetlen zsirsavakat,hiszen ezek lazább,kevésbé rendezett strukturát eredményeznek,ami minden bizonnyal elősegiti a gyorsabb anyagcserét.

Nem lehet ez közönbös számunkra,hiszen az egész élővilág számára szükséges energiát a fotoszintézis során átalakitott fényenergia biztositja. A mérések,ill.azok alapján végzett becslések szerint a fotoszintetizált szén mennyisége kb. 44 milliárd tonna/év,ebből 6 milliárd tonna légzés utján visszajut a levegőbe,tehát a nettó érték 38 milliárd tonna/év.Ebből 16 milliárd a szárazföldön,22 pedig az óceánokban kötődik meg,

/Farkas G., 1978./

Azt,hogy a klorofil saját fluoreszenciájának vizsgálata jól használható a membránok fázisátmeneteinek vizsgálatára, /Fork,1975./mutatják azok a kisérletek is,amelyek során exogén zsirsavak adagolása után mérték a fluorszencia hőmérséklet-függését./Siegel, és mtsai,1981.,Brody,Barber,Tredwel,1981./

Nagyon értékes információt kaphatnánk olyan mutáns,foto-szintetizáló szervezetek vizsgálatával,amelyeknél a mutáció érinti a fotoszintetikus membrán felépitését.A Chalamydomonas reinchardii zöld algának ismeretesek fényérzékeny /un.yellow/ mutánsai,amelyek a zöldülés mértékében/és öröklődési tipusban is/különböznek egymástól. A különböző mutánsok kloropasztiszaainak szerkezete igen eltérő,eltérő továbbá a klorofill, ill.egyéb pigmentek akkumulációjának mértéke.Feltehető tehát, hogy a membrán lipidösszetételében is igen jelentős változás következett be.Azért is célszerü ennek az algának a vizsgálata, mert ismertek a proteinjei/Gyurján,1983./Tudjuk,hogy a menmbránok fázisátmeneteit a proteinek is jelentősen befolyásolják. /Gier és mtsai,1982./

Ismeretesek zsirsav - ill. lipidszintézist gátló szerek. A szakirodalomban is ismert vegyszerekkel kezelt fotoszintetizáló szervezetek eltérő lipid és zsirsavösszetételü membránjainak tulajdonságait vizsgáltuk.Ezek a mérések jól kiegészitik az ugyenezekről a vegyületekről más módszerekkel szerzett információkat.Ezen vizsgálatokhoz a membrán állapotváltozásait jelző DPH membránba történő beépitését használtuk.

Tudjuk,hogy az utóbbi időben több kritika is éri ezt a módszert/Mely-Goubert,Freedman,1980./,de több oldalról szerzett mérési eredmények összevetésével mégis jó közelitéssel információt szerezhetünk a membrán állapotáról. Mind ezeket figyelembe véve amennyire lehetett igyekeztünk ismereteket szerezni a DPH bioembránokban/ elsősorban fotoszintetizáló membránokban/ való alkalmazásra vonatkozóan is.

4. Elméleti áttekintés

4.1. Membránmodellek

A biológiai membránok molekuláris szerkezetének felderitése évtizedek óta a biokémia,biofizika,valamint az ultrastrukturakutatás középpontjában állt. A szerkezet felderitése jelentősen elmaradt annak ellenére, hogy a membrán igen sokoldalu funkciójáról elég sok ismeretet sikerült szereznünk.Ez valószinüleg annak tulajdonitható,hogy nincs olyan közvetlen módszer,amellyel ezt a struktúrát jól tanulmányozhatnánk.Eddigi ismereteinket főleg közvetett módszerek szolgáltatták,mint pl. röntgendiffrakciós módszerek,polarizációs optika,különböző spektroszkópiai módszerek.A közvetlen módszerek közül az elektronmikroszkópia emlithető,amely igen sokat fejlődött az utóbbi időben,sok uj módszerrel is gazdagodott.

A sejtmembránról szerzett ismereteink az alábbi főbb csomópontokon keresztül bővültek:

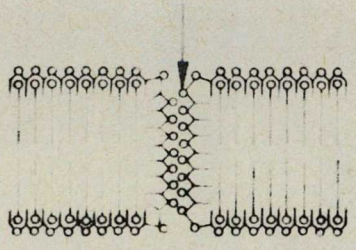
1, Lipidekben oldódó anyagok könnyen bejutnak a sejtbe. Ezt figyelte meg 1895-ben Overton,majd ebből arra következtetett, hogy a sejtet vékony lipidréteg veszi körül,vagyis a sejthártyát vékony lipidréteg alkotja.

2, Gortel és Grendel 1925-ben erythrocyta membránokból lipideket extraháltak.Az extraktumot vizen teritették szét. Azt tapasztalták,hogy az igy létrehozott monomolekuláris film /amely lipidekből keletkezett/felülete mindig kétszer akkora, mint azé a sejté,amelyből az extrakció történt.

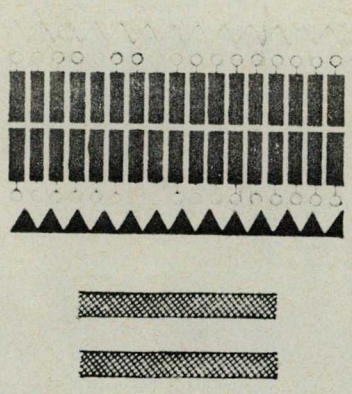
3, Ugyancsak Gortel és Grendel állapitották meg,hogy a membránok fehérjéket is tartalmaznak.Megállapitották,hogy a sejtek felületi feszültsége a mesterséges lipidhártyákéhoz viszonyitva igen alacsony.Ha olajhoz kis mennyiségü fehérjét is adunk, felületi feszültsége /vizre vonatkoztatva/ egy nagyságrenddel is csökkenhet.

4, Danielli és Davson elméleti meggondolások alapján már 1935-ben arra a következtetésre jutott,hogy a sejthárgyát radiálisan orientált kettős lipidréteg alkotja.Ezt két oldalt hidrátburokkal rendelkező globuláris fehérjék fogják közre.
Az elmélet használhatóságát Schmitt 1936-ban röntgen diffrakciós vizsgálatokkal igazolta.

5. A sejtmembránok morfológiájának tanulmányozására 1954-től kezdődően az ultravékony metszetek készitésével,ill. nehézfémrögzitők /ozmium-tetroxid,bikromát,petmanganát/alkalmazása vált alkalmassá. Ilyen vizsgálatokkal a membrán /nagy felbontásban/ trilamináris szerkezetet mutat.Ebben a trilamináris szerkezetben két szélső sötétebb réteg között /mely az ozmiofil rétegek nagyobb elektronszórása miatt jön létre/egy vastagabb,világos réteget figyelhetünk meg.Robertson 1957-ben ezt a membránt elemi membránnak/"unit membrane"/nevezte el, ugyanis a legkülönbözőbb állati és növényi sejtek sejthártyáján ill.intracelluláris membrámokon ezt a szerkezetet láthatjuk.



a



b

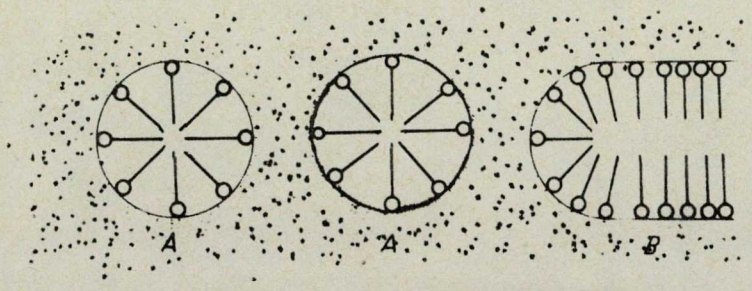
1.ábra

a/ Danielli-Davson-féle membránmodell/pórusmodell/,b/Robertson paucimolekuláris modellje

Magából az elektronmikroszkópos képből még nem következik egyértelmüen az általánosan elfogadott unit membráne modell. A pontositáshoz további modelellenőrzésekben való vizsgálat volt szükséges.

Robertson feltételezte,hogy a fehérjék elhelyezkedése a membrán két oldalán asszimetrikus.Ebben a paucimolekuláris modellben a belső /citoplazma felőli/ oldalon fehérjék, a külső oldalon pedig glikoproteidek vannak.Azt is feltételezte, hogy ezek a fehérjék nem globulárisan helyezkednek el,mint Danielliék szerint,hanem kinyujtott, béta konfigurációban.

6. 1963-ban Sjostrand intracelluláris membránokban/egér vese mitokondriumaiban és endoplazmatikus retikulumaiban/ globuláris alegységeket mutatott ki./$KMnO_4$-os fixálást alkalmazott.Ezek a strukturák kb.5 nm.átmérőjü , 1-2 nm.vastagságu szept mok által elválasztott, periodikusan ismétlődő egységek. Sjöstrand megfigyeléseit a következőképpen interpretálta: a membránban a lipid molekulák globuláris micellumokat alkotnak, ahol a lipid molekulák poláris végei a micellumok felszinén helyezkednek el és fehérjével vannak körülvéve.



2.ábra

Sjöstrand globuláris alegységmodellje
/A lipid molekulák globuláris micellákat alkothatnak,amelyek a sejt müködése során lemez szerkezetté alakulhatnak./

7, Hasonlóan az előzőhöz Green és munkacsoportja is elveti a membránok lipid kettősréteg/= lemezes micellum elmélet/elméletet, és az alegység elméletet /=globuláris micellum elmélet/ támogatja /1966/

8, Tisztán morfológiai vizsgálatokkal nem lehet eldönteni, hogy a sokféle elképzelés közül melyik lehet a valósághoz a leginkább megfelelő.Singer és Nicolson az addigi eredmények alapján a következő megfigyeléseknek megfelelően próbáltak meg újabb modellt szerkeszteni:

- a membránlipidek kettős réteget alkotnak
- a membránok nagyon változatosak,de tulnyomó részt hidrofob oldalláncokat tartalmazó aminósavakból épülnek fel
- a membrán fehérjekomponensei véletlenszerü eloszlásban találhatók,nagymértékben mozgékonyak
- sok membránfehérje a lipid környezetből igen nehezen szakitható ki.Többnyire csak detergensek segitségével sikerül izolálásuk/sőt más drasztikus módszerek alkalmazásával is bizonyos mennyiségü lipiddel asszociálva maradnak/.

Mindezek alapján 1972-ben az alábbi elképzelést vázolták. /Singer és Nicolson,1972./

A membrán alapszerkezete egy lipid kettősréteg,amely főleg foszfolipidekből áll.Ebbe a kettősrétegbe merülnek a fehérjék, ott "úsznak úgy,mint a jéghegyek a vízben. A fehérje poláros oldalláncai a lipidréteg poláris régiójával léphet gyenge kölcsönhatásba,mig az apoláris oldalláncok az apoláris régióval lépnek diszperziós kölcsönhatásba./Előfordulhat az is igy,hogy egyes fehérjék átérik a membránt./

A fentiekből következik,hogy a fehérjék,de a lipidek is igen könnyen végezhetnek horizontális irányu mozgásokat a membránban.Érthető ez,hiszen csupán a gyenge másodlagos kémiai kötőerők átrendeződésére van szükség. A lipid molekulák átfordulására is van lehetőség,de az kevésbé valószinű. Nagyobb energia kell ahhoz is,hogy a fehérjéket kiszakitsuk a lipidkörnyezetből.Ezt az is okozza,hogy a gyenge Van der Waals kötések felszakitása mellett biztositani kell a hidrofób oldalláncok vizes környezetbe való juttatását is /azaz a H-hid kötések felszakitása is szükséges/.

Igy.pl.érthető,hogy a fehérjemolekulák gyorsan eloszlanak a sejtmembránban/lehetőleg egyenletesen/,hiszen az oldalirányu mozgásokhoz szükséges kötésátrendeződésekhez a termikus energia is elegendő.Éppen az utóbbi okok magyarázzák azt is,hogy a hőmérséklet miért befolyásolja ezt a mozgást.

4.2. A kloroplasztisz felépitése és szerkezete

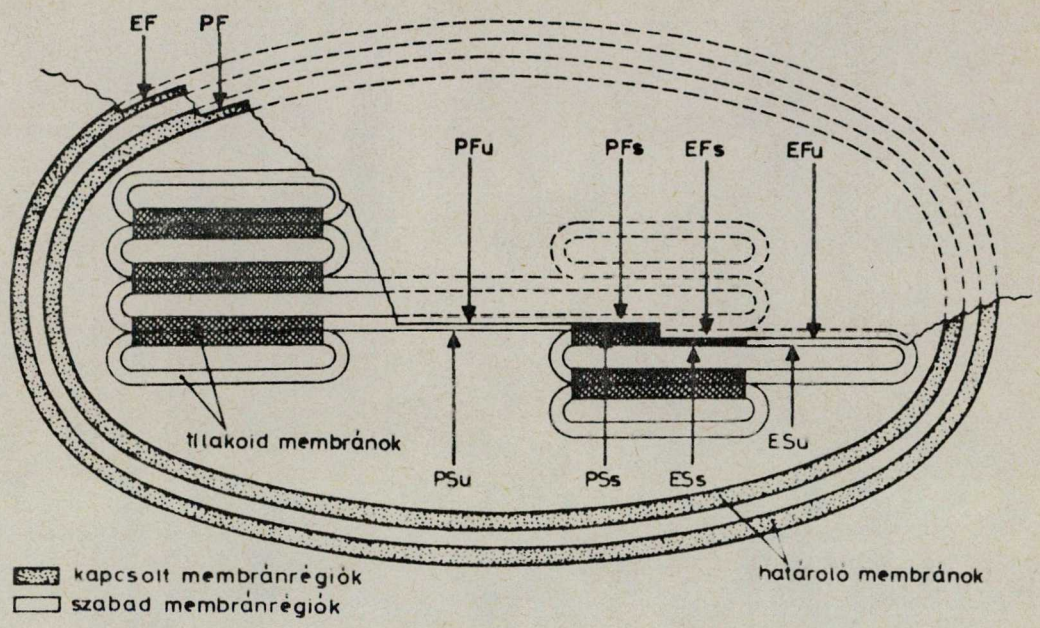
Bár a kloroplasztiszról az első megfigyeléseket már /mintegy 3oo éve/Leeuwenhoek is megtette,a részletesebb vizsgálatokhoz az elektronmikroszkóp feltalálásáig várni kellett.Ekkor derült ki a membránózus szerkezet,sőt az első fixálások eredményeképpen a membránt "unit membrane"szerkezetünek vélték.

A kloroplasztisz átlagosan 4-6 µm hosszu,2-3 µm vastag,lencse alaku képződmény,amelyet kettős membrán/un.envelope/burkol. A fotoszintetizáló zöld növények jellegzetes organelluma.Elektronmikroszkópos képe jellegzetes,hiszen belső membránrendszere összefüggő lamellarendszer/thylakoid/,amely granumra és sztrómalamellára különül.A pénzoszlopszerü képletet /grana/belül üreges,egymásba kapcsolódó membránok alkotják. Átmérője o,2-o,4 µm. A gránumokat egymáshoz sztrómalamellák kapcsolják./Mühletaler,1971./ A sztróma és a gránarendszerek között tehát igen szoros a kapcsolat,üregrendszerük összefüggő,ontogenetikusan is azonos eredetüek Lényeges különbség van azonban élettani , funkcionális szepontból a két rendszer között.

Mint korábban emlitettem,a korábbi technikák az akkor elfogadott "unit membrána" modellt erősitették meg, a fotoszintetikus membrán felépitésében is.Az elektronmikroszkópos technika fejlődésével /freeze-fracturing,freeze-etching technikák/ valamint az ujabb membránbiokémiai vizsgálatok alapján ez a modell idejét múlt.Sokkal inkább a Singer és Nicoloson által javasolt fluid mozaik modell egyik speciális esetének tekinthető.

A fagyasztva töréses ill.maratásos technika egyértelmüen megdöntötte azt az elképzelést,mely szerint a membránt egyforma gömbölyded alegységek kvantoszómák rétege alkotja./Park és Biggins , 1964./ Ezen elképzelés szerint ugyanis az alegységek teljesen egyenértéküek lennének funkcionálisan is.Az újabb elektronmikroszkópos felvételeken viszont a különböző törésfelszineken többféle paratikulum vált láthatóvá.Logikusnak tünik,hogy ezeket a paratikulumokat a Z-séma egyes szakaszainak feleltessük meg.

A 3.ábrán a kloroplatisz elektromikroszkópos szerkezetének vázlatát láthatjuk.Az ábrán a röviditések a fagyasztva töréses ill.maratásos technikával láthatóvá tehető felszineket jelölik. /Staehelin, 1976./



3. ábra

A kloroplatisz membránok valódi és törési felszinei és azok elnevezése

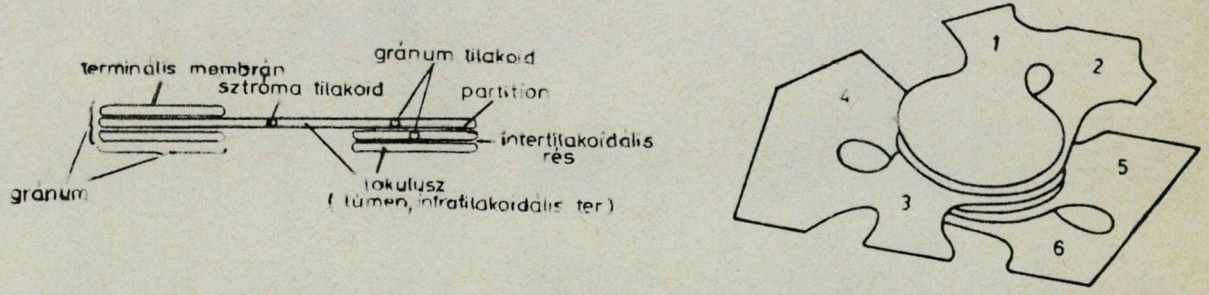
EF /exoplasmic fracture face/ = a tilakoid membrán lúmen felöli alrétegének törési felszine

PF /protomlasmic fracture face/ = a komplementer,sztróma felöli alrtégeg törési felszine / Branton és mtsai,1975/

ES /exo-/ill.PS/ protoplasmic surface/ = maratással láthatóvá tehető felszinek

s /stacked/ = gránumokból láthatóvá tett felszinek

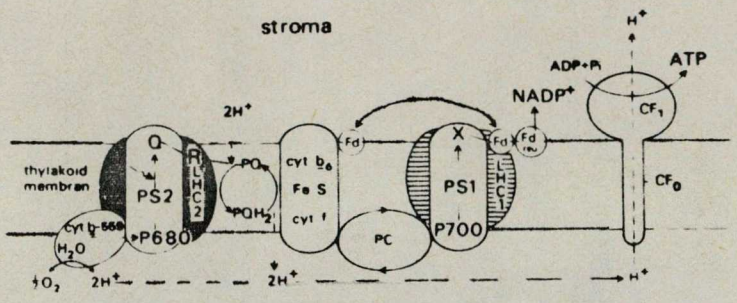
u /unstacked/ = sztómalamellák valódi vagy törési felszinei



4.ábra

A kloroplatisz belső membránrendszere és annak terminológiája ill. a grána és a sztróma lamellák kapcsolata

A 4.és 5.ábrán a kloroplatisz finomszerkezetét láthatjuk. A 4.ábra a kloroplatisz belső membránrendszerét mutatja és annak nevezéktanát,mig az 5.ábrán szupermolekuláris fehérjekomplexek elhelyezkedését láthatjuk.



5.ábra

A szupramolekuláris fehérjekomplexek elhelyezkedése a tilakoid membrámban / Anderson , Andersson, 1982/

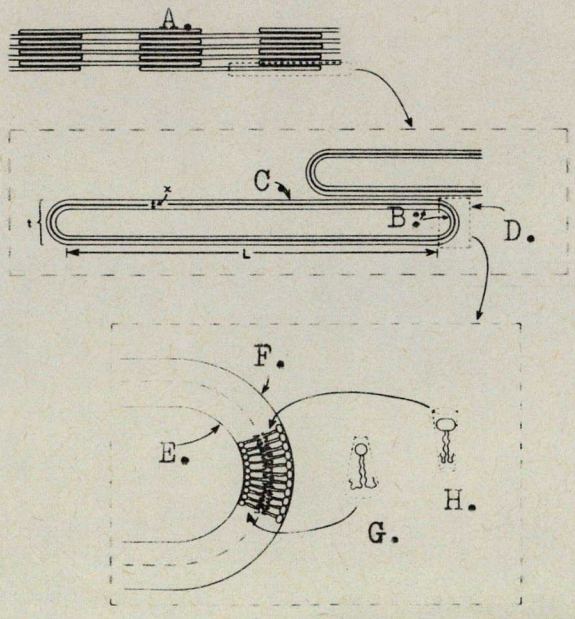
Az egyik legelfogadottabb elképzelés szerint a membránban öt szupramolekuláris fehérjekomplexet különithetünk el.

- PS II.
- PS. I.
- citokróm b/f komplex
- ATP szintetáz komplex
- fénygyüjtő komplex

/Anderson és Andersson, 1982.,Andersson és Anderson,198o., Anderson,1981./

Mesterséges modellmembránok vizsgálatai alapján az utóbbi a kloroplasztisz membrán /különös tekintettel a lipidmatrix/ finomszerkezetére vonatkozóan ujabb elképzelések születtek. A Singer és Nicolson által bevezetett és ma már általánosan elfogadott fluid-mozaik membránmodell kiegészitésre szorul. Nem magyarázza elég jól a görbült felszinek/mint pl. a margin/ szerkezetét valamint a hidrofób fehérjék membránba történő beépülését, stabilizációját.

A többkomponensü lipidvezikulákban a lipidek elhelyezkedése asszimmetrikus. A kis poláris csoporttal rendelkező /mint pl. PE, MGDG/ főleg a belső rétegben, mig a nagy poláris csoporttal rendelkező, /pl. PC, DGDG/ a külső rétegben helyezkednek el. Feltételezhető, hogy a kloroplasztisz belső membránrendszerében is hasonló elrendeződés lehetséges.



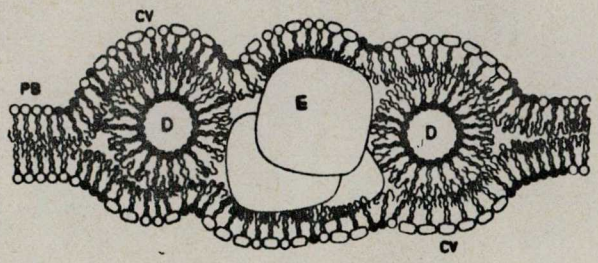
6. ábra

A lipidek feltételezett elhelyezkedése a tilskoid membránban /A, tilakoidok; B, belső réteg; C, külső réteg; D, marginális membrán; E, konkáv felszin; F, konvex felszin; G, MGDG; H, DGDG;/

Az a tény, hogy a kloroplasztisz fő lipidje a galaktolipid /főleg MGDG/ különös figyelmet érdemel. Ez a lipid ugyanis fiziológiás körülmények között nem lamelláris, hanem hexagonális strukturát képez /Hex_{II}/ /Sen és mtsai, 1981./

Azt találták, hogy az MGDG/DGDG = 2:1 arányu vizes rendszer, amely arány a tilakoidban találthoz hasonlit /lamelláris és invertált micelláris formát egyaránt tartalmaz. /Sen és mtsai. 1981., Sen és mtsai, 1982./

Az invertált micelláris strukturának szerepe lehet a fehérjekomplexek membrában való stabilizációjában. /7. ábra/



7.ábra

Az invertált micellák által indukált deformációk a tillakoid membránban.

CV =convex membrán felszin lipidrégiója

PB =planáris lipidrégió

D = invertált micella

E = hidrofob protein

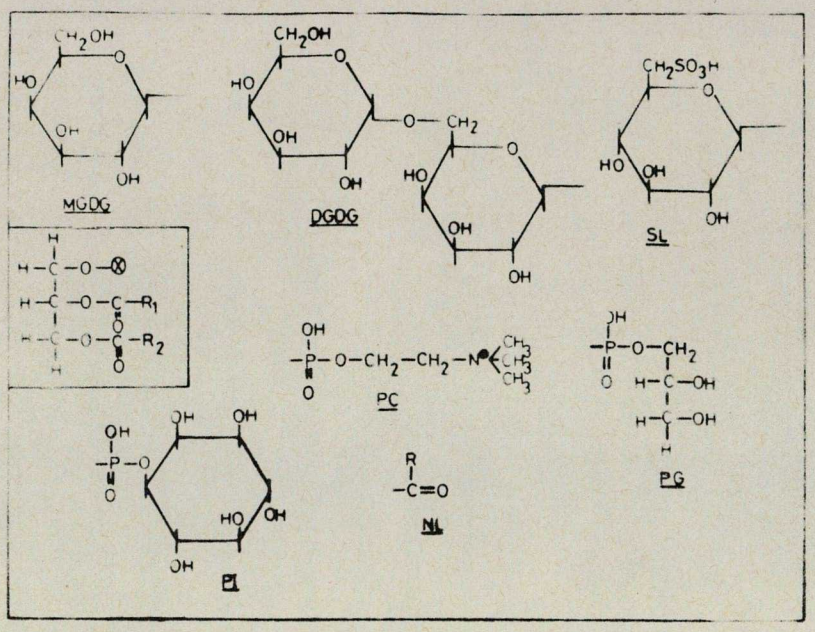
Kloroplaszt - lipidek

A kloroplasztiszmembránok az egyéb sejtalkotókkal összehasonlitva igen sajátos lipid és zsirsavösszetétellel rendelkeznek.A zöld levelek lo %, a kloroplasztisz 35 %, a tilakoid membránok 5o %, lipidet tartalmaznak / Leech és Murphy,1977./ A kloroplasztiszban előforduló lipidek /Benson,1971./kémiai szerkezetét a 8.ábra mutatja.

Mint fent emlitettem,a kloroplasztiszt sajátos lipidösszetétel jellemzi.Egyrészt eltér a többi sejtalkotótól,másrészt jellegzetes különbség van az envelope és a tilakoid között is. A kloroplasztiszt magas glaktolipid és alacsonyabb foszfolipid tartalom jellemzi. Foszfatidil-kolin,szemben a tilakoiddal,amelyben főleg foszfatidil -glicerid van. /Mackender és Leech,1974./ Az envelope -ban a GL/FL és az MGDG/DGDG arány kisebb.

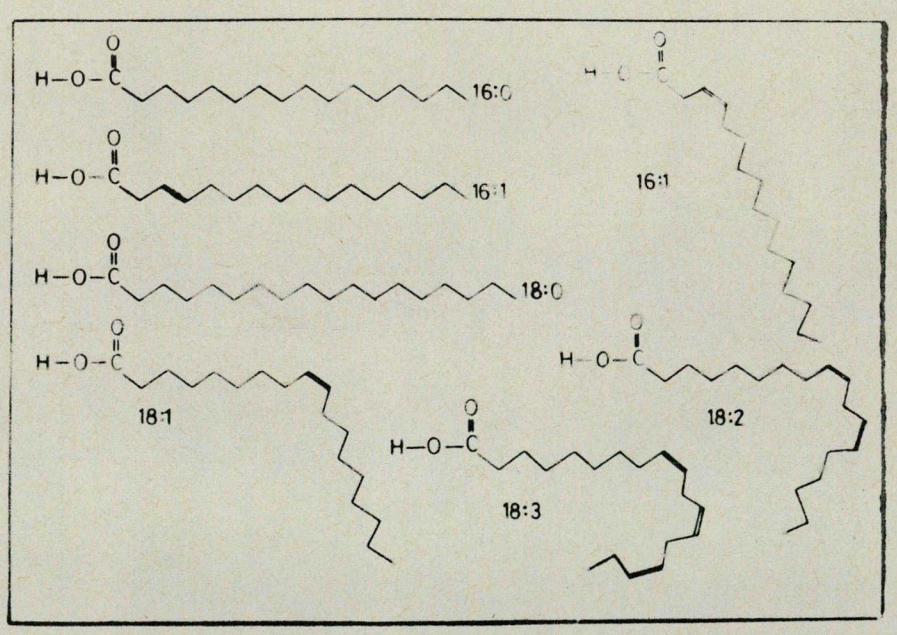
A kloroplaszt -lipideket felépitő zsirsavak a következők:

16:0	palmitinsav	hexadekánsav
16:1	palmitoleinsav	9-hexadecénsav
18:0	szterainsav	oktadekánsav
18:1	olajsav	9-oktadecénsav
18:2	linolsav	9,12-oktadekadiénsav
18:3	linolénsav	9,12,15-oktadekatriénsav



8. ábra

A kloroplasztiszban előforduló lipidek



9. ábra

A kloroplasztisz felépítésében szerepet játszó zsirsavak szerkezete

Meg kell jegyeznünk, hogy a 18 szénatomos zsirsavak cisz helyzetü kettős kötést tartalmaznak. A kloroplasztisz-lipidek közül a linolénsav igen magas százalékban fordulhat elő. A telitett/telitetlen zsirsavak aránya alacsonyabb a tilakoidokban, mint az envelopeban. A galaktozil-gliceridek különösen gazdagok α-linolenátban mindkét pozicióban, mig a foszfatidil-gliceridek főleg az 1. pozicióban. Az utóbbiak palmitátot is tartalmaznak gyakran 2. pozicióban. /Quinn és mtsai, 1982./

A fotoszintetikus membrán fontos komponensei még a karotinoidok is, a melyek hosszu izoprenoid molekulák, konjugált kettőskötéseket tartalmazó láncrészből és telitetlen, szubsztituált ciklohexán gyürüből épülnek fel. Mivel tágabb értelemben ezeket is a lipidek közé soroljuk, fontos ezeket itt megemlitenünk, egyrészt azért, mert a kloroplasztisz strukturális és funkcionális bázisának fontos összetevői, másrészt mert a fotoszintetikus membrán fizikai kémiai sajátosságainak befolyásoló tényezői lehetnek.

4.3. Lipidek, biomembránok fázisátmenete, membránfluiditás, és azt befolyásoló tényezők

Membránfluiditás és meghatározói

A szokásos biológiai hőmérsékleteken a membránlipidek félfolyékony "mesomorf" állapotban vannak. /Gounnaris és mtsai, 1983./ Mint korábban a membránmodellek ismertetésénél emlitettem, a lipid-lipid, ill. a lipid-protein kölcsönhatás már viszonylag kis hőmérsékletváltozás esetén is jelentős változást szenved. Nem meglepő tehát, hogy ezen részecskék diffuziója hőmérsékletfüggő. Akár laterális, vagy rotációs diffúzióról legyen szó, akár a membránrészecskék transzverzális elmozdulásáról.

A membránt alkotó komponensek mozgékonysága a membrán állapotát jellemző paraméter, amelyet fluiditásnak nevezünk. A membránfluiditásnak igen nagy szerepe van az élő szervezetek alkalmazkodóképességében, denagyon fontos szerepet játszik a celluláris szintü regulációs mechanizmusokban is. /Leshem és Inbar, 1977., Shinitzky és Inbar, 1974./

A membránfluiditást befolyásoló tényezők

1, Függ a lipidréteg összetételétől - a telitett/telitetlen lipidek arányától, a foszfolipid poláris csoportjának természeté-

től, de a szénhidrogénlánc hosszától is. /Ford és Barber, 1983., Sklar és mtsai, 1977.,Gounnaris és mtsai, 1983./

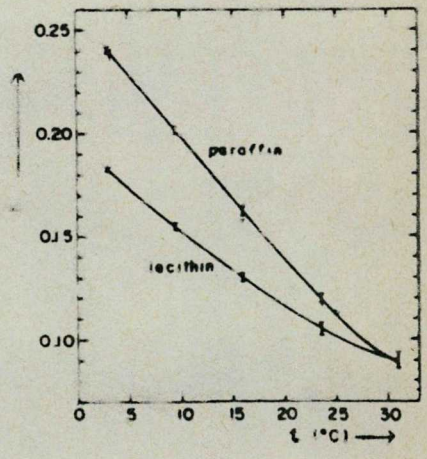
Minél nagyobb a telitett/telitetlen zsírsavak aránya annál kevésbé fluid a membrán. Jól látható ez pl. Cogan és mtsai méréséből. /Cogan és mtsai, 1973./ I. táblázat.

I. Táblázat

	Mikroviszkozitás /P/				
	10°C	20°C	25°C	37°C	45°C
Triolein	3,4	1,8	1,3	0,64	0,36
Tojáslectin	2,4	1,5	1,2	0,73	0,53
Tojáslecitin / koleszterol = 1,5/1	26,0	15,0	12,0	6,4	4,4
Dipalmitoillecitin	12,0	10,5	9,4	3,9	0,94
Dipalmitoillecitin / koleszterol = 6/1	52,0	44,0	36,0	11,0	1,8
Dipalmitoillecitin / koleszterol =3/1	91,0	69,0	53,0	19,0	3,2
Tojás lizolecitin	1,6	0,97	0,77	0,45	0,33
Cetil-dimetilamin-oxid		0,69	0,59	0,34	0,24

Következtethetünk erre a laterális nyomás méréséből is. Érthető ez, hiszen a membrán kvázi-kétdimenziós szerkezetéből következik a membránkomponensek oldalirányu elmozdulása /a membrán síkjában történő diffuzió/. /Cherry, 1979./

2, A fenti táblázatból látható a mesterséges modellmembrán viszkozitásának hőmérséklettől való függése is. Jól látható ez Robert E Dale méréseiből is. /Dale és mtsai, 1977./ A 1o. ábrán a fluoreszcencia anizotrópia hőmérséklettől való függését láthatjuk. Az emissziós anizotrópiából következtethetünk a közeg mikroszkópikus viszkozitására a később ismertetésre kerülő módon



1o. ábra.

Paraffin olaj és tojáslecitin liposzómákban mért DPH fluorezscencia-anizotrópia hőmérséklettől való függése.

3, A membránok mikroviszkozitását a proteinek jelenléte is nagy mértékben befolyásolja /II. táblázat/. Általában a fázisátalakulási hőmérséklet felett jelentősen nő a fluoreszcenciapolarizáció, ami a mikroviszkozitás növekedését jelenti. /Heyn, 1979./

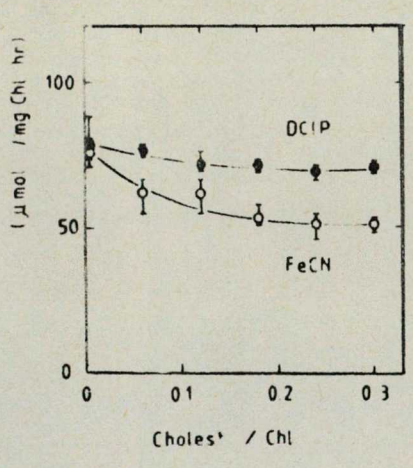
II. Táblázat

	Polarizációfok
Folyékony paraffin	o,o75 ± o,oo5
Tojáslecitin liposzómák	o,o83 ± o,olo
Liposzómák szérumprotein inkorporáció után	o,116 ± o,olo

/Mély-Goubert és Freedman, 198o./

A fázisátalakulási hőmérséklet alatt a lipoproteid rendszerekben kisebb mértékü polarizációfok változás mérhető. Egyes esetekben a proteinek jelenléte csökkentheti a fluiditást. Ez azonban minden bizonnyal a membrán felületi jelenségeivel van összefüggésben és nem intramembrán jelenségről van szó.

A polarizációfok növekedése a membrán fluiditásának csökkenését jelzi. Ez egyben természetesen azt is jelenti, hogy a membrán lipidmátrixában csökken az elektrontranszportlánc egyes tagjai közötti kölcsönhatás. Ezt az elméleti meggondolást igazolja Yamamotó és mtsai Hill-reakció méréseivel. /11. ábra/



11. ábra.

Koleszteril-hemiszukcinát hatása fericianid és DCIP fotoredukciójára /Yamamotó és mtsai, 1981./

A membránok fázisátmenete

Gittler 1972-ben kimondta, hogy a sejtmembrán egyik fő jel-

lemzője a lipid kettősréteg fluid állapota. Szobahőmérsékleten a tilakoid membrán relative fluid. /Ford és Barber, 198o./ A hőmérséklet változásával azonban /mint ezt az előző fejezetben láthattuk/ ez a fluiditás jelentősen változik. Egy bizonyos hőmérsékleten ugrásszerü változás következik be. Ezt a pontot a szilárd anyagok olvadásának analógiájára "olvadáspontnak", vagy fázisátalakulási hőmérsékletnek nevezzük. Ezen a hőmérsékleten ugyanis jelentős szerkezetmódosulás történik a membránban. A hőmérséklet emelkedésével a gél fázisu membrán folyadékkristályos állapotba megy át.

A membránok fázisátmeneteit nagy mértékben meghatározzák a lipidek fázisátmenetei. Ez azonban a lipid minőségén kivül függ a környezettől is. Más dehidratált /száraz/ közegben, mint hidratált környezetben, eltérő értéket kapunk lipoproteid rendszerekben is. /Chapman, 1975., Pringle és Chapman, 1981./ A III. táblázatban néhány foszfatid "olvadáspontját" láthatjuk vizmentes és vizes közegben.

A IV. táblázatban pedig a zsirsavak fázisátalakulási hőmérsékletét láthatjuk mind telitett, mind pedig telitetlen zsirsavak esetén. A III. táblázat azt mutatja, hogy a hidratált lipidek fázisátmenetei jóval alacsonyabb hőmérsékleten következnek be. Hasonlóan jelentősen csökken a fázisátmeneti hőmérséklet a telitetlenség mértékével. /Mint ezt a IV. táblázatból láthatjuk./ Meg kell jegyeznünk, hogy a fázisátmenet hőmérséklete vizes közegben nemcsak a szénhidrogénlánc hosszától, minőségétől és a molekula poláris régiójának természetétől függ, hanem a viz mennyiségétől is, és az abban oldott anyagoktól is.

Chapman és munkatársai 1967-ben meghatározták az 1,2-diacil-L-foszfatidil-kolin /lecitin/ fázisdiagramját /Chapman, 1975./, amelyet a 12. ábrán mutatunk be.

Különböző adatok jelentek meg arra vonatkozóan, hogy a fehérjék ill. polipeptidek hogyan befolyásolják a fázisátmenet hőmérsékletét. /Chapman és mtsai, 1974./

Összefoglalóan tehát a membrán fázisátmenete a következő változásokkal jár: /a hőmérséklet emelésével/

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtár SZEGED

III.Táblázat

Lipidek fázisátmenetei

A/Vizmentes lipidek / Chapman 1975/

	T_m /°C/
1,2- diacil-foszfatidil-kolin	23o
1,2- diacil-foszfatidil-etanolamin	196
1,3- diacil-foszfatidil-etanolamin	198
1,2- diacil-foszfatidil-szerin	16o
1,2- diacil-foszfatidil-inozitol	136
1,2-diacil-foszfatidil- glicerol	67
1,2- diacil-foszfatidsav	71
1,3- diacil-foszfatidsav	7o
Szfingomielinek	21o
Lizofoszfatidil-kolin	24o
Lizofoszfatidil-etanolamin	2o5
B/ Hidratált lipidek	
Tojáslecitin	-12 - -7
di-C_{12}-foszfatidil-kolin	-2
di-C_{14}-foszfatidil-kolin	23
di-C_{16}-foszfatidil-kolin	41
di-C_{18}-foszfatidil-kolin	55
di-C_{22}-Foszfatidil-kolin	75
di-$C_{18:1}$-foszfatidil-kolin	-22
di-C_{14}- foszfatidil-etanolamin	5o
di-C_{16}- foszfatidil-etanolamin	6o
di-C_{14}- foszfatidil-szerin	38
di-C_{16}-foszfatidil - szerin	51-55[1]/72[2]

1/ az elektrolitok jelenlététől függően

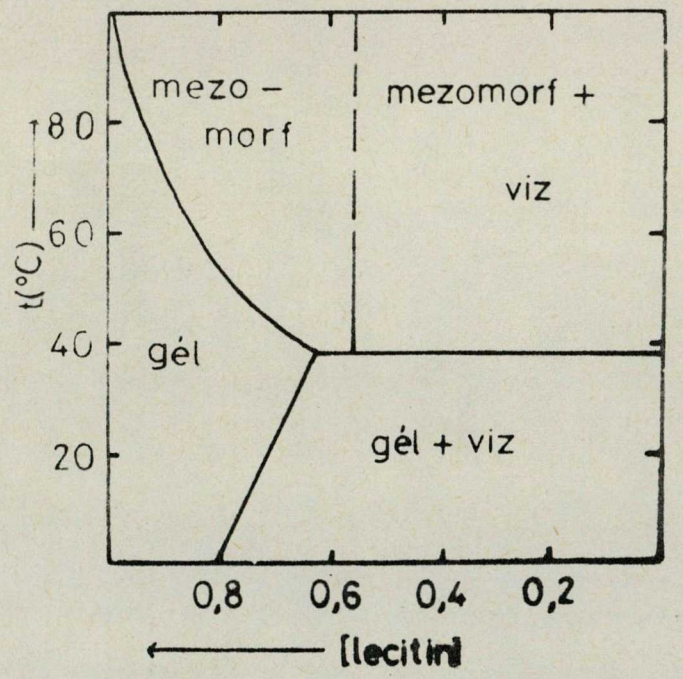
2/ alacsony pH-n

IV. Táblázat

Különböző zsirsavak szerkezete, kémiai, triviális neve, fázisátalakulási hőmérséklete

Szerkezet	kémiai név	triviális név	Tm /°C/
Telitett sirsavak			
12:0	dodekánsav	laurinsav	44,2
14:0	tetradekánsav	mirisztinsav	53,9
15:0	pentadekánsav		52,3
16:0	hexadekánsav	palmitinsav	63,1
17:0	hektadekánsav	margarinsav	61,3
18:0	oktadekánsav	sztearinsav	69,6
19:0	nonadekánsav		68,6
20:0	eikozánsav	arachidonsav	76,5
22:0	dokozánsav	beheninsav	81,5
24:0	tetrakozánsav	lignocerinsav	86,0
Egy kettős kötést tartalmazó zsirsavak			
16:1ω7	9-hexadecénsav	palmitoleinsav	-o,5-o,3
18:1ω9	9-oktadecénsav	oleinsav	13,4 /α/
			16,3 /β/
18:1ω9 trans.	trans-9-oktadecénsav	elaidinsav	44,5
18:1ω7	11-oktadecénsav	vacceninsav	44,0
2o:1ω11	9-eikozénsav	gadoleinsav	24,5
22:1ω11	11-dokozenoinsav	cetoleinsav	32,5
22:1ω9	13-dokozenoinsav	erucinsav	34,7
24:1ω9	15-tetrakozénsav	nervoninsav	42,5
Több kettőskötést tartalmazó zsirsavak			
16:2ω6	7,1o-hexadekadiénsav		
18:2ω6	9,12-oktadekadiénsav	α-linoleinsav	-o,5- -5,2
18:2ω7	6,11-oktadekadiénsav	cilineinsav	
16:3ω3	7,1o,13-hexadekatriénsav		
18:3ω3	9,12,15,oktadekatriénsav	α-linoleinsav	-1o- -11,3
18:3ω6	6,9,12-oktadekatriénsav	γ-linoleinsav	
16:4ω1	6,9,12,15-hexadekatetraénsav		
18:4ω3	6,9,12,15-oktadekateraénsav		
18:4ω3	9,11,13,15-oktadekatetraénsav	parinársav	85 - 86/α

Szerkezet	kémiai név	triviális név	T_m/°C/
20:4 ω6	5,8,11,14-eikozatetraénsav	arachidoninsav	-49,5
20:4 ω3	8,11,14,17-eikozatetraénsav		
18:5 ω3	3,6,9,12,15-oktadekapentaénsav		
20:5 ω3	5,8,11,14,17-eikozapentaénsav		
22:5 ω6	4,7,1o,13,16-dokozapentaénsav		
22:5 ω3	7,1o,13,16,19-dokozapentaénsav	clupanodonsav	
22:6 ω3	4,7,1o,13,16,19-dokozahexaénsav		-44,5- -4



12.ábra

A lecitin fázisdiagrammja

a, A lipidrács expanziója és a membrán vastagságának növekedése.

b, A $-CH_2-$ csoportok -C-C- kötés körüli rotációjának csökkenése.

c, Az $-N^+CH_3$ csoportok mozgékonyságának a csökkenése.

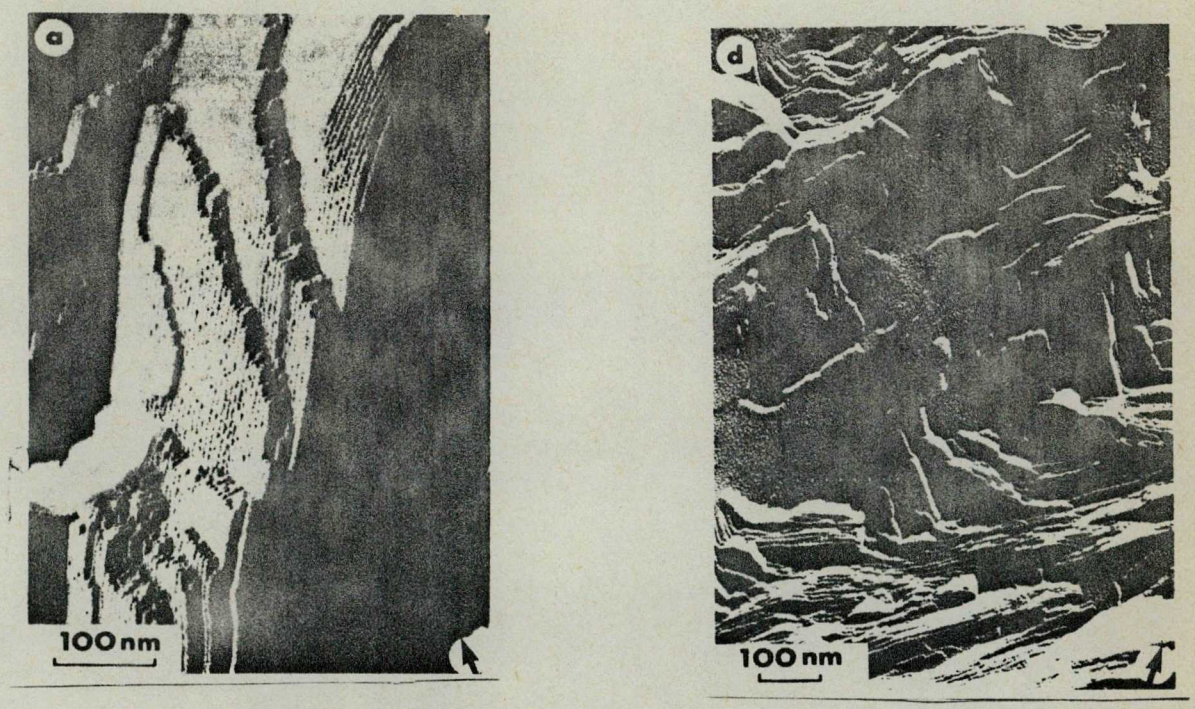
d, A lipidek diffuziójának csökkenése.

e, Számos egyéb változás, ami megnyilvánul a lipidek poláris anyagokhoz való /pl. vizhez/ kötődésében.

/Sanderman, 1978./

A lipidek vizes fázisban különböző strukturákat alkothatnak a szénhidrogénlánc , valamint a poláris csoport minőségétől függően. Az előbb emlitett sajátosságoktól függ az is, hogy a fázisátalakulás során melyik formák alakulnak egymásba.

Pl. A monogalaktozil-diacilglicerol dilinolenoil származéka szobahőmérsékleten vizes közegben Hex_{II} strukturát képez /hexagonális struktura/, mig a disztearoil származéka szabályos lemezes szerkezetet alkot. Bab kloroplasztiszból izolált nativ lipidek jellemző invertált hexagonális szerkezetet /Hex_{II}/ alkotnak. Ezekre jellemző az, hogy a kettős kötések száma átlagosan 5,44/molekula.

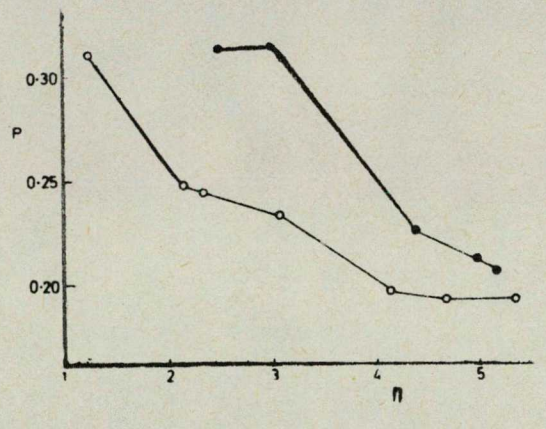


13. ábra

Bab kloroplasztiszból izolált nativ lipidek szerkezete eletronmikroszkópos felvételeken. /a ábra:kettőskötésindex 5,44/molekula. b ábra: kettőskötésindex 3,88/molekula./

A 13. ábrán ez látszik az elektronmikroszkópos felvételen /a kép/. A másik képen, ahol ugyanez az érték 3,88, tipikus lamelláris szerkezet látható. Tipikus lamelláris struktura látható nativ lipidek esetén is - 28 °C-on. /Gounnaris és mtsai, 1983./

A fentiekből tehát következik, hogy a nativ lipidekből előállitott liposzómák fázisátmenete, ill. fluiditása függ a zsirsavak szénhidrogénláncának kettőskötésindexétől. A 14. ábrán láthatjuk, hogy a totál lipid frakcióban a polarizációfokban fokozatos emelkedés tapasztalható a telitettség növekedésével /Gounnaris és mtsai, 1983./ Figyelemre méltó, hogy a galaktolipid frakcióban élesebbátmenet látható, valamint a görbe magasabban fut.



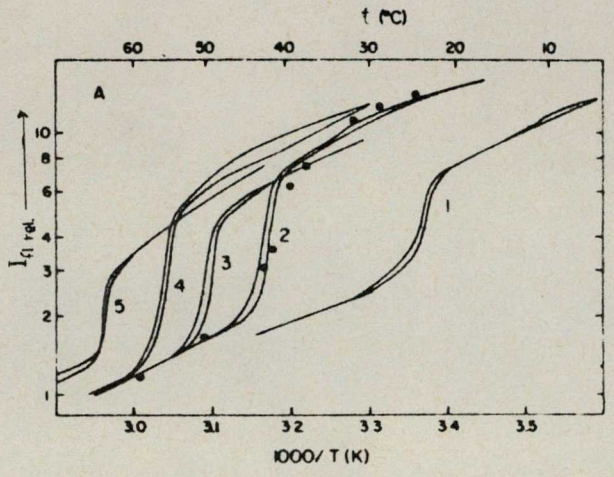
14. ábra

DPH fluoreszcencia polarizációfok bab növény kloroplasztiszból izolált totál poláris lipidben /o-o-o-/ ill. galaktolipidben /●-●-●-//n=kettőskötés index/

A magasabbrendü növények kloroplasztiszainak membránlipidjei, különösen a galaktolipid frakció szokatlanul magas plién zsirsavlánccal jellemezhető. A cisz helyzetü kettőskötést tartalmazó szénhidrogénlánc inszerciója a lipidbe jelentősen csökkenti a fázisátalakulási hőmérsékletet. /Phillips, 1972./ Ugyanakkor a fluiditás, mint azt DPH-val jelezhetjük nagy mértékben növekszik. /Stubbs és mtsai, 1981./

A membránok fázisátmenetei hasonló tényezőktől függenek, mint

a fluiditás. Igazolja ezt L.A. Sklar és munkatársai mérése parinársav jelzőmolekula alkalmazásával. /15. ábra/
/parinársav: a Parinarium glaberrina növény magjából izolálható természetes polién származék, kémiai nevén 9,11,13,15-oktadekatetraénsav. A fázisátmenet vizsgálatához mindkét izomerjét alkalmazhatjuk. -α=cisz,transz,transz,cisz, β= csupa transz/



15. ábra

Különböző liposzóma rendszerek fázisátmenete transz parinársav jelzőmolekula alkalmazásával /1, DMPC, 2, DPPC, 3, Me_2DPPE, 4, DSPC, 5, DPPE/

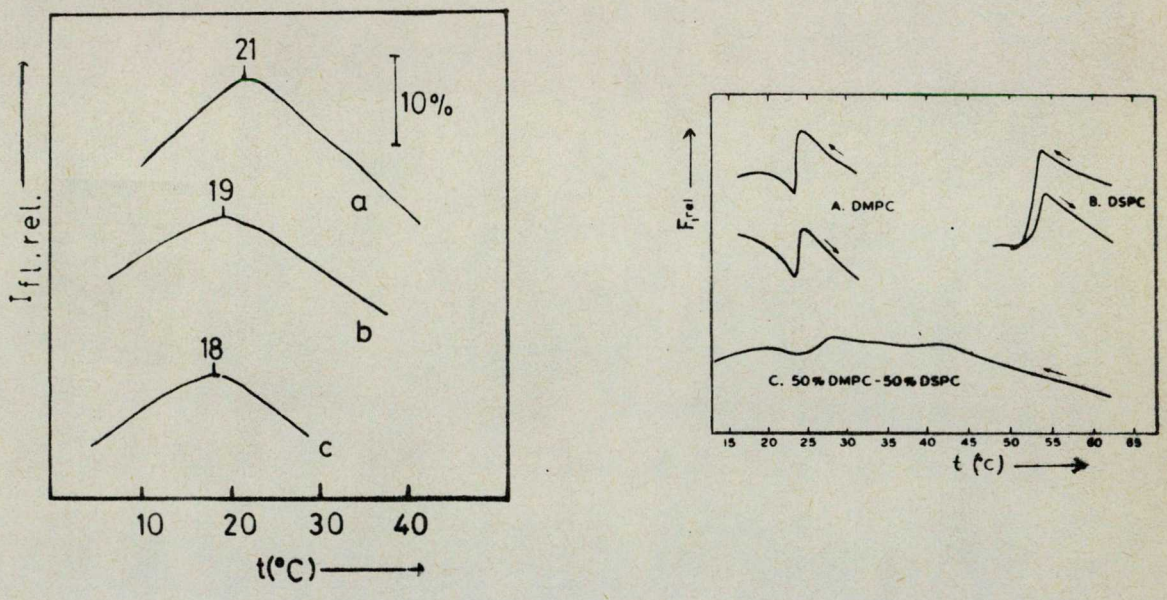
4.4. Fázisátmenet meghatározása a klorofill saját fluoreszcenciája alapján Chlorella pyrenoidosa és Chlamydomonas reinchardii yellow mutáns algákban

In vivo rendszerekben a membrán szerkezetében bekövetkező változás fluoreszcenciás módszerrel történő mérésére elvileg két lehetőség is adódik. Az egyik az, hogy fluoreszkáló jelzőmolekulát építünk be a vizsgálni kívánt membránba, és annak fluoreszcenciaintenzitását, vagy polarizációfokát mérjük. A másik lehetőség az, hogy kihasználjuk a membránban eleve strukturális, vagy funkcionális szerepet játszó molekula fluoreszcenciáját. A fotoszintetizáló szervezetekben a klorofill-a fluoreszcenciája jól használható erre a célra. Azt a tényt, hogy a klorofill saját fluoreszcenciája jól használható membránok fázisátmenetének vizsgálatára Conrad Colbow fedezte fel 1983-ban.

Klorofillt épitett foszfolipid liposzómákba és mérte annak fluoreszcenciáját a rendszer hütése ill.fütése esetén.Megfigyelte,hogy azokon a hőmérsékleteken,ahol a lipideknek más módszerekkel kapott fázisátmenetei vannak a fluoreszcenciában jellemző változásai vannak./Colbow 1973./

Meg kell jegyeznünk,hogy a lipideknek a fázisátmenete a legtöbb esetben 0°C alatt van a szokásos biológiai körülmények között. Egyszerü rendszerekben jól látható a változás.Olyan összetett rendszerekben azonban,mint pl. a biológiai membránok az egyes fázisátmenetek egymásra szuperponálódnak,és összegzetten jelentkeznek. A fluoreszcencia intenzitásokban bekövetkező változások a 0°C-fölötti tartományban is észlelhetők,de nem olyan élesen,kisebb csúcsc és főleg vállak formájában.

Fotoszintetizáló rendszerek belső fluoreszcenciáját először David C.Fork és Norio Murata használta a membrán fázisátmenetének jellemzésére. /Murata és tsai,1975.,Fork,1975./Egy ilyen mérést láthatunk a 16. ábrán.



16.ábra

Fázisátmenet meghatározása klorofill - a fluoreszcenciájával.

A, Klorofill a fluoreszcencia-intenzitás hőmérséklet-függése intakt sejtben /a/membránfragmentben /b/és lipid klorofill extratumban/c/

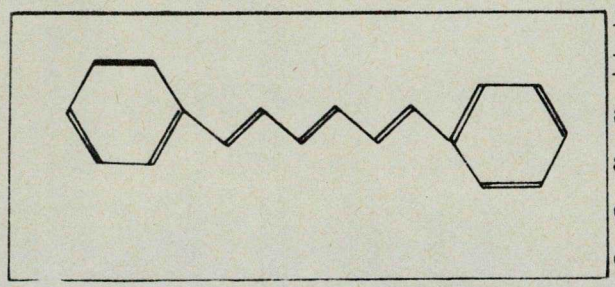
B, Klorofill-a fluoreszcencia-intenzitás hőmérsékletfüggése DMPC,DSPC liposzómákban,ill.azok 5o %-os elegyében.

Az élőlények hőmérséklethez való alkalmazkodása többek között abban nyilvánul meg,hogy megváltozik membránszerkezetük.Ez természetesen a membrán fluiditását is megváltoztatja,amit fotoszintetizáló szervezeteknél a belső fluoreszcencia mérésével jelezni lehet.Ezt figyelték meg Fork és munkatársai 1976-ban./Fork,Murata, Avron,1976./ Általános természeti jelenség a hőmérséklethez való alkalmazkodás ugy,mint ahogy az is,hogy a mutációk az élőlények egész sor változatait hozzák létre.Ismeretesek olyan mutáns fotoszintetizáló szervezetek,amelyekből különféle polipeptidek hiányoznak.Mivel korábban már kimutattuk,hogy a fehérjék jelentős tényezői a membránfluiditásnak,célszerü lenne ezen szervezetek membránjainak fizikai-kémiai tulajdonságainak vizsgálataival is foglalkozni. Különösen olyan szervezeteknél,mint a Chlamydomonas reinchardii yellow muténsainál,amelyeknél jól ismertek a polipeptid mutációk,de minden bizonnyal eltérés van a membrán zsirsavösszetételében.

4.5. Az 1.6.-difenil-1.3,5-hexatrién DPH jellemzése,felhasználása a membránfluiditás meghatározására.

Több fluoreszkáló molekula is ismeretes,amelynek fluoreszcenciája növekszik,ha lipidmembránokhoz kötődnek.Ilyenek pl.a DPH,az ANS,az NPN,az AS és sok más anyag még,de az egyre inkább alkalmazott parinársavval zárom a sort.

Kisérleteinkben a DPH-t alkalmaztuk,igy részletesebben most ennek jellemzésére térek ki.



17.ábra.
A DPH szerkezete

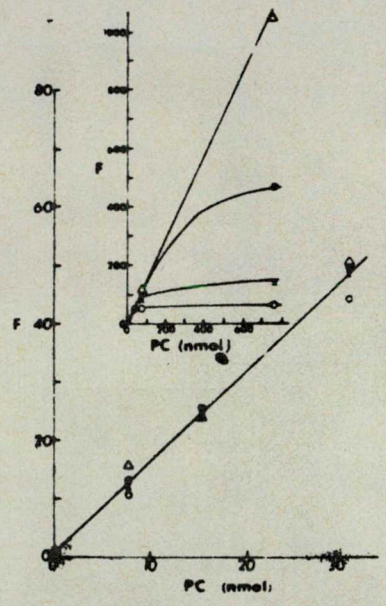
A DPH egy közel rigid bot alaku molekula.Konjugált π -elektronrendszere könnyen gerjeszthetővé teszi a molekulát.Igen magas moláris extinciós koefficiense is /$E_{430} \approx 80\ 000$ $cm^{-1}mól^{-1}$ amely a magas kvantumhatásfokkal együtt lehetővé teszi,hogy igen alacsony koncentrációban is alkalmazhassuk

Kémiailag elég stabil molekula, vizben gyakorlatilag oldhatatlan, erősen lipofil. Éppen ezért könnyen inkorpolálódik lipidmembránokba. Ez az inkorporáció egy időben jól nyomon követhető folyamat. Korábban leirták, /Shinitzky és Barenholz, 1974.,Lentz,Barenholz,Thompson, 1976./ hogy a DPH fluoreszcencianövekedését a

foszfolipid vizes közeghez adagolásának hatására a DPH kettős rétegbe való beépülése okozza. A kémiában általánosan használt megoszlási koefficiensre vonatkozó egyenlet csak korlátozottan érvényes.

$$\frac{DPH_{lipid}}{DPH_{aq}} = K\ /Vol_{lipid}/Vol_{aq}/$$

A telitődésig a DPH/PC aránya alacsonyabb, mint o,1 M/1o M, igy relative kevés DPH molekula kötődik minden vezikulához. A linearitás határa függ a DPH arányától. Attól a koncentrációtól, amikor a DPH feleslegben van a foszfolipidhez viszonyitva /a PC telitve van a DPH-val/ a fluoreszcencia lineárisan változik a PC koncentrációval. /18. ábra/



18. ábra
DPH fluoreszcenciaintenzitás különböző PC ill. DPH koncentrációk mellett.
/o/o,1 M; /x/o,5 M; /o/2,o M; /Δ/4,o M DPH

Annak ellenére, hogy nagyobb koncentrációknál ez a felső limit kiterjed, ajánlatosabb a kisebb koncentrációkat alkalmazni, mert 2 M felett már jelentkezik a depolarizációja is. Az előnyös koncentráció kiválasztását nagyban befolyásolja az a tény is, hogy a DPH oldhatósága vizben gyakorlatilag majdnem nulla. Ha nagyobb mennyiséget injektálunk a rendszerbe, akkor az apoláris molekula kolloid részecskéket képezve zavarosodást okoz, és ezek jelenlétével is számolnunk kell. Nagyon fontos betartani az inkubációs hőmérsékletet is, mert a DPH a mobilisebb folyékony kristályos fázisba gyorsabban penetrálódik.

Mindezeket figyelembe véve Barber és Ford 198o-ban kidolgozták a tilakoid membránok fluiditásának vizsgálatát a DPH alkalmazásával. Meg kell jegyeznünk, hogy a szakirodalomban alkalmazott metodika koránt sem egységes, pl. az az alkalmazott koncentrációk több félék lehetnek, de a törzsoldat is más-más oldószerekkel készült. A metodikát tehát minden esetben a vizsgálandó objektumhoz alkalmazkodva kell kidolgozni.

Minden vizsgálatot tehát meg kell előznie a legoptimálisabb koncentrációviszonyok megkeresésének.

A fluoreszcencia-polarizációfok, ill.fluoreszcencia-amizotrópia mérésekből következtethetünk a fluoreszkáló molekula közvetlen környezetének mikroviszkozitására a következő egyenletből:

$$\frac{r_o}{r} = 1 + C/r/\ \frac{T\tau}{\eta} \quad , \text{ /Perrin egyenlet/}$$

ahol:

r = emissziós amizotrópia

r_o = határaminozotrópia

τ = a gerjesztett állapot élettartama

η = viszkozitás

$C/r/ = \frac{k}{v}$ /k = Boltrman állandó/ /v/= molekulatérfogat/

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}}$$

I_{II} mind az emissziós,mind a gerjesztési polarizációs szürő vertikális /0^o/ állásban van. $I_{\perp}$: a gerjesztési polarizációs szürő vertikális /0^o/,az emisszos szürő pedig horizontális /90^o/ állásban van.

4.6. A kisérletek során alkalmazott gátlószerek hatásának rövid jellemzése.

Méréseinkben a különböző zsirsav és lipid szintézist gátló szerekkel kezelt fotoszintetizáló szervezetek membránjainak fázisátalakulási hőmérsékletére voltunk kiváncsiak.Ez természetesen függ a membrán összetételétől.A kisérleti eredmények értelmezése végett célszerü röviden áttekinteni az általunk alkalmazott gátlószerek hatásmechanizmusát.

A kiséleteinkben használt anyagok:

- cerulenin
- piridazinonszármazékok közül a SAN 6706,SAN 9789 és a SAN 9785 kódszámu vegyületek
- fenetilalkohol
- metronidazol

Ezek a vegyületek az irodalomban sem ismeretlen herbicidek,ill. antibiotikumok.

Cerulenin /2,3- epoxi-4-oxo-7,1o-dodekadienol-amid/

Az anyagot a Cephalosporium caerulens nevü gombafaj egyes törzsei termelik./Hata és mtsai,196o./ Nagy hatásu antibakteriális és antifungális szernek bizonyult./Awoya és mtsai,1975./ Növekedést gátló hatása exogén zsirsavak adagolásával rendszerint revertálható volt. Kimutatták,hogy a cerulenin minden bizonnyal kovalensen kötődik a - ketoacil-tioészter szintetáz enzimhez, amely a zsirsavszintézis kondenzáló enzime./Agnolo és mtsai,1973./ A cerulenin hatását eddig főleg mikrobiális rendszerekben vizsgálták. Fotoszintetizáló szervezetekben Herczeg Tamás és Lehoczki Endre vizsgálatai adtak jelentős eredményeket az utóbbi időben /Lehoczki,Herczeg,Szalay,1979.Herczeg,Lehoczky,F rkas,Rojik, Szalay,1979./

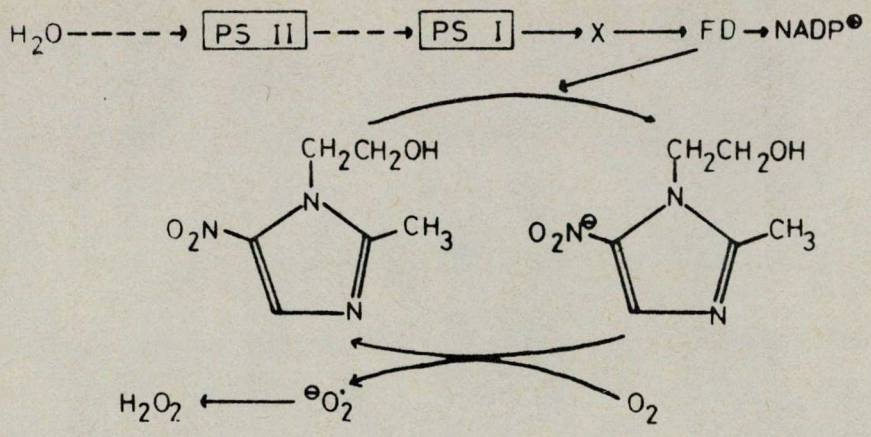
Fenetil-alkohol /FA, 2-fenil-etanol/

A természetben is megtalálható aromás vegyület.Elektrontranszport és zsirsavszinézisgátló hatását állapitották meg.Ezekre a hatásokra bakteriofágokon /Benab és mtsai,1962./ E.colin /White és mtsai,1979./végzett vizsgálatokból következtettek.A telitetlen zsirsavak bioszintézisére gyakorolt hatása valószinüleg a palmitol-CoA-deszaturáz gátló hatásán alapszik./Nozawa és mtsai, 1979./ Igen kevés a növényeken végzett vizsgálatok száma. G.Knutsen a következőket állapitotta meg./ Knudsen,1966./

1, A sejtek növekedését, DNS és klorofillszintézisét már 4,2 mM koncentrációban is jelentősen /9o%/ gátolja.
2, Már a második órában teljes gátlást lehet elérni 21 mM koncentrációban alkalmazva
3, 33,6 mM FA hatására 1 óra múlva a fotoszintézis 19 %-ra 1,5 óra múlva pedig lo %-ra csökken a kontrolhoz képest.
4, 21 mM FA 1 órás kezelés esetén 7o %-kal csökkenti az oxigéntermelést
5, 8,4 - 21 mM-ig minden koncentrációban gátolja a légzést is.

Metronidazol /MA, 1-/2 - hidroxi-etil/-2-metil-5-nitroimidazol/

Jól ismert ez az imidazol származék a gyógyászatban is antibiakterális hatásáról. A fotokémiai rendszerekben hatóhelyéül a ferredoxin -függő NADP-reduktázt jelölték meg/Edward és mtsai, 1974., Schmidt és mtsai,1977./ 19.ábra.



19. ábra

A metronidazol feltételezett hatás mechanizmusa

Piridazinon herbicidek

Három szubsztituált piridazinon származék állt rendelkezésünkre. Gyári jelölésüket alkalmazva ezek a SAN 67o6, SAN 9785, SAN 9789 voltak.

Mint általában a herbicideknél ezeknél is jellemző propmt hatást, ill. másodlagos hatást lehet kimutatni. Propmt hatásként gátolják a fotoszintetikus CO_2 fixálást, a Hill-reakciót, és az O_2 kiválasztást is. Másodlagos hatásként tehát az anyagcserefolyamatokban kifejtett hatásként kimutatták a lipidek és a fotoszintetikus pigmentek bioszintézisének gátló hatását.

Ezen általános hatások után most emlitsük meg az egyes tipusok speciális hatásait.

SAN 67o6

Az a megfigyelés, hogy az erős fényen nevelt növények levelei kifehérednek /SAN 67o6 kezelés hatására/ -gyakorlatilag a karotinoidok protektiv szerepének hiánya miatt a klorofillok fotooxidációt szenvednek-, valamint a biokémiai vizsgálatok is igazolják, hogy a vegyszer gátolja a karotinoidik bioszintézisét. Egyes mérések azt igazolják, hogy hatására megnő a karotinoidok bioszintézisében szerepet játszó prekurzorok felhalmozódása.

Ezek után várható, hogy a zsirsav, ill. lipidek mennyisége arányában is változás következik be.

1. Tudjuk, hogy a telitetlen zsirsavak arányának növekedése,

ill. a telitetlenség mértékének növekedése csökkenti a növények fagyérzékenységét.SAN 67o6 hatására csökken a 18:3 /linolénsav/linolsav/ arány.
Érdekes módon ezzel a vegyszerrel kezelt növényeknél a kezelés a fagyérzékenységet nem befolyásolta.

2, A deszaturáció csökkentése mellett növeli a telitetlen zsirsavak arányát.

SAN 9789

Hasonlóképpen az előzőhöz csökkenti a linolénsav mennyiségét, de csökken az MGDG mennyisége is. Hatásában hasonlit a SAN 67o6 hoz,hiszen fiziológiásan abból alakult át. Ennek ellenére jelentős különbségek is megfigyelhetők a hatásban.A karotinoidok bioszintézisét jelentősen gátolja,fitoin felhalmozódását eredményezi.

SAN 9785

A klorofillok és a karotinoidok bioszintézisét gyakorlatilag nem befolyásolja,és a zsirsavak bioszintézisére jelentős hatással van.Csökkenti a 18:3/18:2 arányt,de érdekes módon nem változtatja meg, a telitett/telitetlen zsirsavak arányát.

5. Anyag és vizsgálati módszerek

5.1. Algatenyésztés,kezelés

A mérésekhez Chlamydomonas reinchardil alga yellow mutánsait /a mit az ELTE Genetika Tanszékéről kaptunk/,valamint Chlorella pyrenoidosa szinkronizált tenyészetét használtuk.A tenyészet "Wuxal" növénytápsó o,2 %-os oldatában nevelkedett állandó levegőbuborékoltatás mellett. A megvilágitáshoz 16 óra világos /lo $W\ m^{-2}$/ és 8 óra sötét periódusú megvilágitást alkalmaztam.Ennek oka az alga egyedfejlődésében van/Péterffi,1977./Egyes méréseknél /a gátlószerekkel kezelt algáknál/ a kezeléstől számitva állandó fényen nevelt algát alkalmazunk. Ezt az értékelésnél megemlitem. Kontrolként a 25 C-on nevelt algát használtam, a többi kultúra hőmérsékletét a mérési eredménye nél fogom feltüntetni.

A gátlószerek koncentrációi a következők voltak:

cerulenin	$22,5 \times lo^{-6}$ M
fenetil alkohol	lo^{-3} M
metromidasol	lo^{-3} M
piridazinon herb.	$2o \times lo^{-6}$ M

A minta beállitása

A mérések kivitelezésének, az eredmények összehasonlithatóságának szükséges feltétele volt az,hogy az alga szuszpenzió mindig azonos sejtszámot tartalmazzon. A kisérletek során a legalkalmasabbnak a $2x10^7$ sejt /cm^3 tartalmazó minta tűnt,amit Bürker-kamarás módszerrel állitottam be.Minden alkalommal 3 x 10 db.1/5 x 1/20 x 1/10 mm-es téglatestben vett sejtek számát átlagoltam.A sejtszámolás során előforduló hiba ± 10 % lehet.

Inkubális exogén zsirsavakkal

Ezekhez a vizsgálatokhoz az adott sejtszámra beállitott mintát 10^{-6} M linolénsav K^+- sójával inkubáltuk. A mintát az inkubációs idő tartamáig / a mérési eredményeknélfeltüntettem/rázatógéppel rázattuk,majd DCMU-val kezelve mértük a fluoreszcencia hőmérsékletfüggését.

5.2. Árpanövények nevelése,kezelése

Ezekhez a mérésekhez árpa/Hordeum vulgare L.var.Horpácsi kétsoros/lábon nőtt növények leveleiből , ill.úsztatott levélszegmenetekből izolált plasztiszokat használtunk.

Csiráztatás,kezelés a gátlószerekkel

Az árpamagvakat 1 napos csapvízben történő "úsztatás"után Petri-csészében két rétegü szürőpapir között csiráztattuk 6 napig, majd 1 mg/5o árpamag mennyiségében 10 Wm^{-2} intenzitású fényen neveltük a mintát a mérésig,amely 72 órás kezelés után történt.A kellő vizmennyiséget naponta pótoltuk./Meg kell jegyeznünk,hogy intakt árpán ceruleninnel kezelt méréseket nem végezhetünk,mert ezek a növények ki sem fejlődnek./

Levélszegmenetek kezelése a gátlószerekkel

A fent leírt módon kicsiráztatott árpa levelekből 6 napos csiráztatás után 6-7 cm-es szegmeneteket metszettünk ki,majd ezeket kezeltük a gátlószerekkel 1 mg cerulenin/g etiolált levél,15 mg piridazinon herbicid/g etiolált levél koncentrációban.
Majd 72 órás kezelés 10 Wm^{-2} intenzitásu fényen történt.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

5.3.Fluoreszcenciás vizsgálatok

A fluoreszcenciaszinképek felvétele Perkin-Elmer MPF-44 A spektofluoriméterrel történt 480 nm hullámhoszzu gerjesztő fény, 8-10 nm-es gerjesztési és 3-5 nm emissziós sávszélesség alkalmazásával.A reabszorció a mérések során elhanyagolható volt.

5.3.1. Fluoreszcenciaszínképek mérése

Az alacsonyhőmérékletü fluoreszcenciasprektumokat a készülék alacsonyhőmérsékletü feltétjével vettük fel.Ennek érdekében a feltét Dewar-palackját folyékony nitrogénnel töltöttük meg a szükséges - 196°C biztosítására. Az algamintákat glicerinnel 2:1 arányban elegyitettem,majd alapos összerázás után megfelelően kialakított rézpálca mélyedésébe cseppentettem,melyet a folyékony nitrogénnel töltött mintatartóba helyeztem.A minta hütésekor a kristályképződés miatt különböző mütermékek keletkezhetnek,amelynek kiküszöbölésére szolgált a glicerinnel való elegyités,valamint a gyors hütés.

5.3.2.Fluoreszcenciaintenzitás mérése

A különböző hőmérsékleten nevelt, a zsirsavszintézis módosító szerekkel kezelt Chlorella pyrenoidosa,valamint a Chlamydomonas reinchardii algák vizsgálatához a fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggését mértük in vivo körülmények között. /A gerjesztő hullámhossz és a résszélességek a fentiek szerint. A megfigyelési hullámhossz 680 nm volt./ A különböző hőmérsékleten nevelt algák esetében a mintát minden esetben a nevelési hőmérséklettől kezdve szakaszosan hütöttük o°C-ig,és az adott hőmérsékleti értékeknél felvettük a fluoreszcencia spektrumot. A 0°C elérése után hasonló módon visszamelegitettük a mintát.

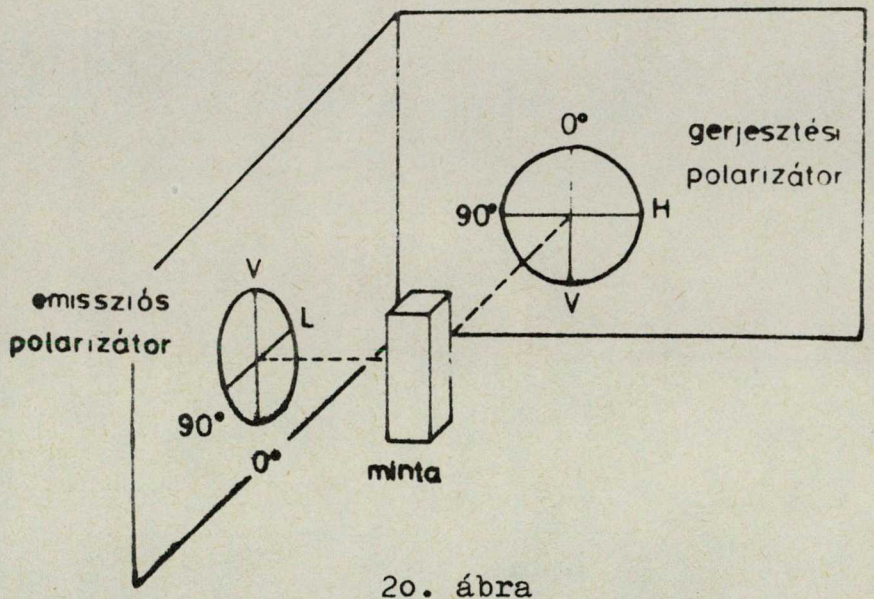
Mind a gátlószerekkel kezelt,mind pedig a Chlamidmonas mutáns algáknál a hőmérséklet pontos változtatásához programozható hőmérsékletszabályozót használtunk,amely Peltier-elemes hűthető-fűthető mintatartó vezérelt.A kiindulási hőmérséklet /az előzővel ellentétben/ minden esetben 35 °C volt. Erről az értékről folyamatosan csökkentettük a hőmérsékletet v = 1°C/perc sebességgel a 0 °C-ig,majd ugyanigy visszamelegitettük a mintát.

A hőmérsékletmérés pontossága ± o, 1°C volt.

Mivel az elektrontranszport folyamata maga is hőmérsékletfüggő,ennek hatásának kiküszöbölésére 10^{-5} M DCMU -val kezeltük a mintát.

5.3.3. Fluoreszcenciapolarizációfok meghatározása és mikroviszkozitás számitása

A membrán mikroviszkozitását a 4.5. fejezeteben emlitett Perrin egyenlet alkalmazásával határoztuk meg. Ehhez meg kellett határoznunk különböző hőmérsékleteken a fluoreszcencia polarizációfokát /ill. ami ebből számithtó a fluoreszcencia anizotrópiát/. Ezekhez a mérésekhez is a Perkin Elmer MPF 44A spektrofluorimetert alkalmaztuk, polarizációs feltétének felhasználásával. A gerjesztő és az emissziós polarizátorok helyzetét láthatjuk a 2o. ábrán./λ=365 nm; λ=43o nm; teljesen nyitott résekkel./



2o. ábra

Vázlat a polarizációfok méréséhez

A polarizációfokot az alábbi képlet alapján számitottuk:

$$P = \frac{I_{vv} - I_{vh}Z}{I_{vv} + I_{vh}Z} \quad , \text{ahol}$$

$$Z = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad .$$

A "Z" korrekciós faktor alkalmazására a különböző állásu polarizátor szürők különböző extinkciója miatt van szükség.

A polarizációfokból kiszámitható "r" fluoreszcencia anizotrópia, amelyből a Perrin egyenlet alkalmazásával a közeg mikroviszkozitása számitható.

$$P = \frac{3r}{2 + r} \longrightarrow r = \frac{2P}{3 - P}$$

Az $\frac{r_o}{r} - 1 = \frac{\eta}{C/r/T\tau}$ egyenletben a bal oldali kifejezést ábrázolva η függvényében közel egyenest kapunk, ha η elég kicsi.Különböző liposzómák és membránok esetén $C/r/T\tau$ = 2,4 poise.Ha ezt az előző egyenletbe behelyettesitjük, r_o- ra o,362-t kapunk, 365 nm-es gerjesztés esetén.Ezekből következik tehát, hogy

$$\eta = \frac{2,4\ r}{o,362 - r}$$

/Shinitzky és Barenholz,1978./

Hangsulyoznom kell,hogy eddig nagyon kevés adat jelent meg a DPH kloroplasztiszmembránban való alkalmazására vonatkozóan. Barber és mtsai 198o-ban dolgozták ki a jelzőmolekula felhasználását tilakoidmembránnak fizikai állapotának jellemzésére.
A módszer bonyolultságát jellemzi,hogy a mai napig is nagyon sok a tisztázatlan kérdés, az alkalmazás feltételei egyáltalán nem tisztázódtak. A mérések kiértékelését neheziti az,hogy a mért objektum rendkivül bonyolult rendszer.Egyrészt azért,mert többkomponensü,másrészt azért,mert a plasztiszon belül is többféle membránrészletek vannak. Sőt,mint előbb emlitettem a bimolekuláris membrán két oldala is nagyon heterogén összetételü.

Az utóbbi időben egyre több ismeretet szerezhettünk a kloroplasztisz különböző tipusu membránjainak fizikai állapotáról is.

Figyelembe kell vennünk azt,hogy közelitő számitásokat végezhetünk, de más vizsgálati módszerekkel kiegészitve alkalmas lehet a különböző rendszerek összehasonlitására.

5.4.Plasztiszizolálás,inkubálás DPH-val

A mérésekhez az árpanövények leveleinek felső 4 cm-es régiójából vettünk mintát,ill.a levélszegmenetek apritás után ultraturaxszal összekevertük az izoláló pufferoldatban/o,33 M szorbitol, o,2 mM $MgCl_2$, 2o mM MES , pH 6,5-re trisz-/hidroximetil/-

/-amino-metánnal/./Nakatani és Barber,1977./A homogenizátumot szűrjük,majd 2500-3000 r.p.m.fordulatszámmal reszuszpendáljuk /Ford és Barber,1983././o,1 M szorbitol,1o mM KCl,1 mM4-/2-hidroxi-etil/-1-piperazin-etán-szulfonsav,pH 7,5-re KCH-dal/

Valamennyi müveletet $4^{o}C$-on végeztük.

Mint azt a 4.5.fejezetben emlitettem, a DPH membránba történő beépülése időben jellemzően változó folyamat. Kb.3o perces inkubálási idő eltelte után válik közel konstanssá a fluoreszcenciaintenzitás.A mérést az is zavarja,hogy a molekula emissziós tartománya éppen egybe esik a fotoszintetikus pigmentek abszorciós tartományával.Mivel a mi mináink a megfigyelés hullámhosszán igen különböző mértékben nyelnek el,azokat az ezen a hullámhosszon mért $OD_{/430/}$-ra standardizáltuk./Liposzóma rendszereknél kézenfekvő az optimális koncentrációt lipid/DPH arányra kell beállutani./ A kérdés csak az,hogy mekkora legyen az alkalmazott DPH koncentráció és mekkora legyen a minta $OD_{/430/}$-a?

Ehhez meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást az idő függvényében,különböző OD-u minták esetén,különböző koncentrációk mellett. A 6.4-fejezetben emlitettek szerint a o,4 plasztisz OD és 7,5 M DPH koncentrációk tüntek a legalkalmasabbnak.

Az is fontos kérdés volt,hogy a törzsoldat milyen oldószerrel készül,hiszen a DPH vízben gyakorlatilag nem oldódik.Viszonylag jól oldódik alkoholban,de az is hamar telitetté válik.Igen jól oldódik tetrahidro-furánban,amelyet a szakirodalomban is alkalmaznak/ /Ford és Barber,1983./ Az sem mindegy,hogy milyen tömény a törzsoldat,hiszen a DPH is és a tetrahidro-furán is zavarosodást okozhat a mintában,ami zavarhatja a mérést.A kolloidkémiában ismert Weimarn féle szabály szerint a relatív túltelitettség meghatározza a keletkező részecskék méretét, a diszperzitásfokot. Márpedig ha a DPH kolloid részecskék formájában kicsapódik,az neheziti a membránba történő beépülést,ill.annak fázisátmenetét is bemérhetjük a minta mérése során.

A kisérletek során a legalkalmasabbnak a tetrahidrofuránban oldott lo mM koncentrációjú oldat tünt.Megjegyzendő,hogy a szakirodalom ebben a kérdésben koránt sem egységes,így azok eredmények igen nehezen,vagy egyáltalán nem reprodukálhatók.

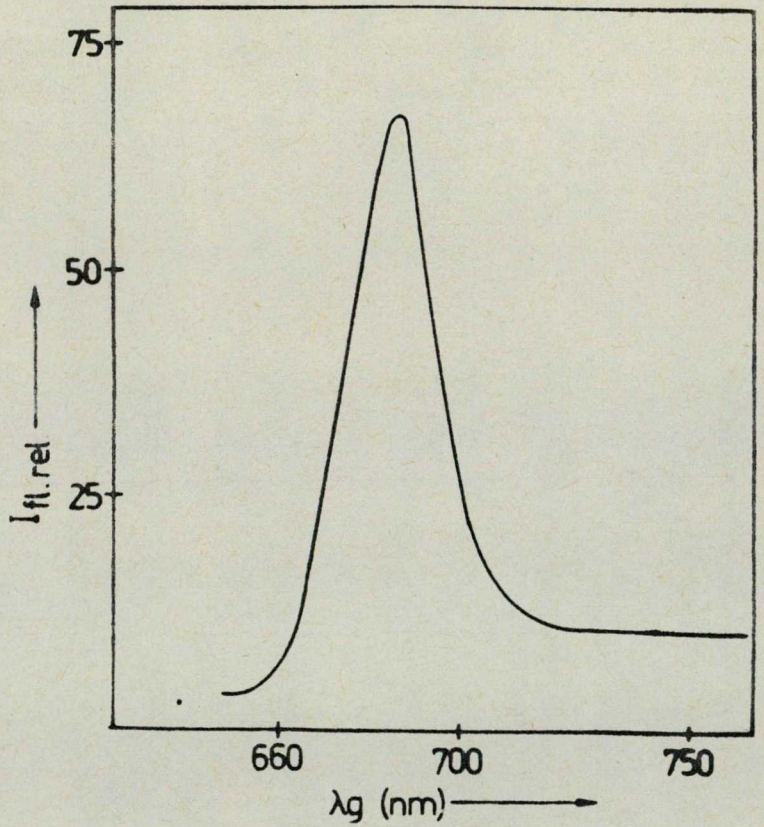
Méréseink során tehát az előbbiekben leírt módon izolált árpa plasztiszt $OD_{/430/}$= o,4-re állitottuk be,ezt 7,5 μM DPH-val 4o'-ig inkubáltuk szobahőmérsékleten.

6. Kisérleti eredmények és megvitatásuk

6.1. A nevelési hőmérséklet hatása alga kloroplasztiszmembrán fluoreszcenciatulajdonságaira

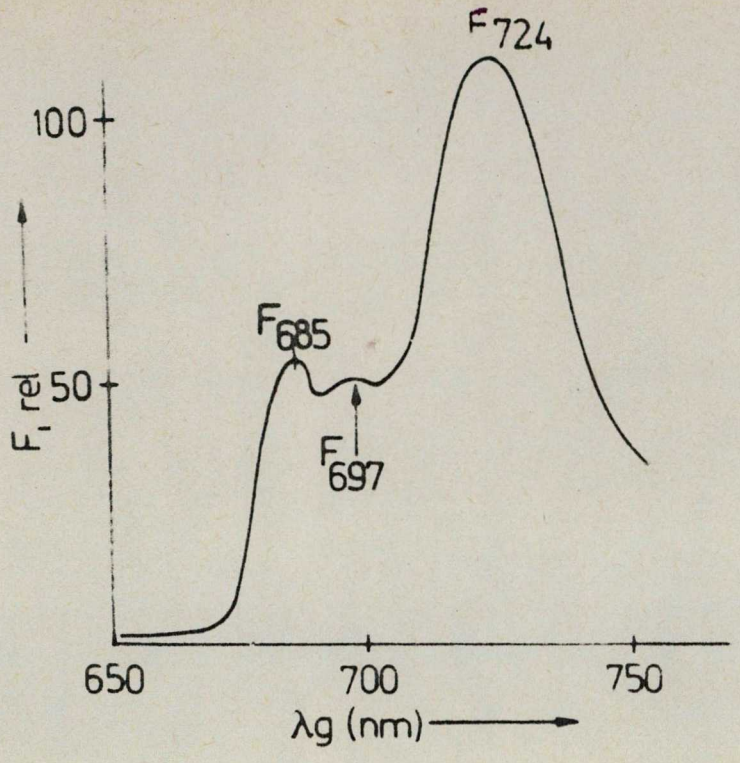
Jól ismert, hogy a fotoszintetikus pigmentek által elnyelt fényenergia egy része nem alakul át kémiai energiává, hanem különböző módon hasznosithatatlanná válik. Az egyik ilyen energiavesztési folyamat, amikor az elnyelt fény fluoreszcenciaként leadódik, kisugárzódik a környezetbe. A fluoreszcenciavizsgálatok fontos információt szolgáltatnak a fotoszintetikus membrán állapotáról. Igy pl. több klorofillforma különithető el a különböző hullámhosszakon megfigyelt fluoreszcencia-gerjesztési szinképek alapján. /Heath, 1973., Litvin és mtsai, 1978., Strasszer és Butler., 1977./

Szobahőmérsékleten a Chlorella alga fluoreszcenciaspektruma egy egy maximummal rendelkező görbe /F_{685}/. Ez a spektrum azonban alacsony hőmérsékleten három komponensre bontható. Ezek a komponensek F_1 = 685, F_2 = 697, F_3 = 724 nm-nél jelentkeznek. Ezt láthatjuk a 21. és a 22. ábrán.



21. ábra

Chlorella alga szobahőmérsékletü fluoreszcencia-spektruma

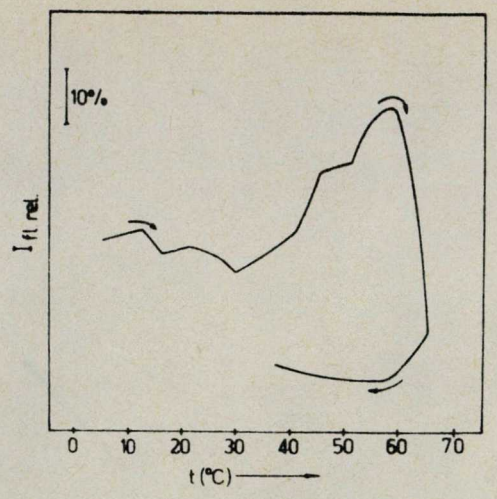


22. ábra

Chlorella alga mélyhőmérsékletü fluoreszcenciaspektruma

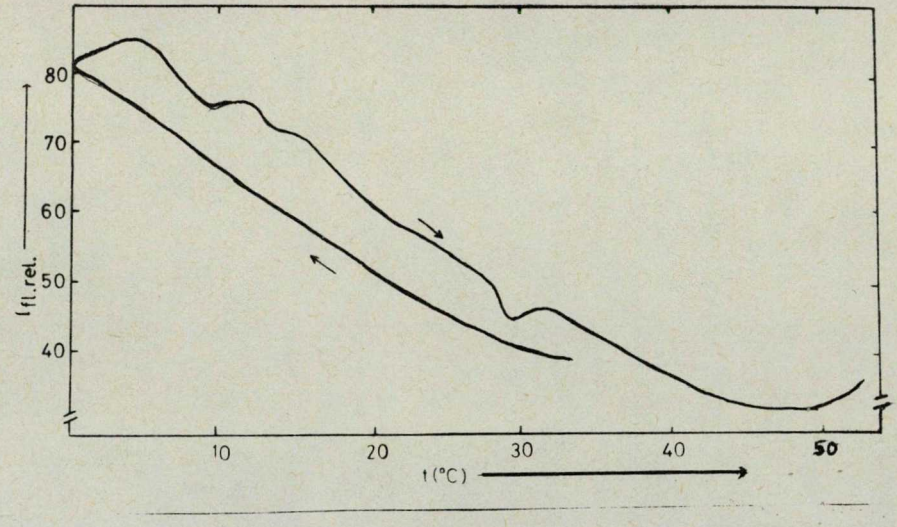
A fotoszintetizáló szervezetek belső klororfill-a fluoreszcenciája jól használható a membránok fázisátmenetének vizsgálatára. /Fork, 1975./ A minta hőmérsékletét változtatva változás következik be a membrán alkotórészeinek halmazállapotában: 0 °C körül elsősorban a viz, 0 és 5o °C között főleg a lipidek, 5o °C fölött pedig a proteinek konformációs változásai dominálnak. Mivel, mint láttuk a klorofillok szoros kapcsolatban vannak a membránban mindhárom molekulaféleséggel, ezért a fluoreszcencia hatásfokukra nagy hatással van a membrán alkotórészeinek fázisváltozása. /Itt szeretném megjegyezni, hogy a fluoreszcenciaintenzitás és a fázisátmenet kapcsolatában több figyelmet kellene forditani magára a fluorokrómra is. Itt elsősorban a klorofill molekula fitol láncának a membrán fizikai állapotára gyakorolt hatására kell gondolnunk./

A 23. ábrán a 24 °C-on nevelt Chlorella alga hőmérséklet-fluoreszcenciaintenzitás görbéjét mutatjuk be. Az ábrából látható, hogy 15 °c és 25 °C körüli tartományban kisebb vállak jelentek meg majd 6o °C körül a fluoreszcenciaintenzitás jelentősen megnő. A 15 ill. 25 °C körüli vállak a lipidek fázisátmeneteinek felelnek meg, /Murata,Ono,Sato, 1977./, mig a 6o°C körüli sáv a proteinek



23. ábra
Chlorella alga hőmérséklet-fluoreszcenciaintenzitás görbéje /0 °C-ról melegitve/

denaturációs hőmérsékletével mutat egyezést. látható, hogy a mintát visszahütve jelentős esés következik be a fluoreszcenciaintenzitásban, ugyanakkor a görbe strukturátlanná válik. Ez a görbemenet minden bizonnyal a fehérjék irreverzibilis kicsapódásával magyarátható, mint ezt korábbi mérések is igazolják /Fork,Murata, 1976.,Avron, 1977./ A proteinek fázisátmeneteinek vizsgálata márcsak azért is lényeges, mert Chen és Bens megállapitásai szerint a sejtek hővel szemben irezisztenciája analóg a proteinek hőállóságával /Chen és Bens, 198o./



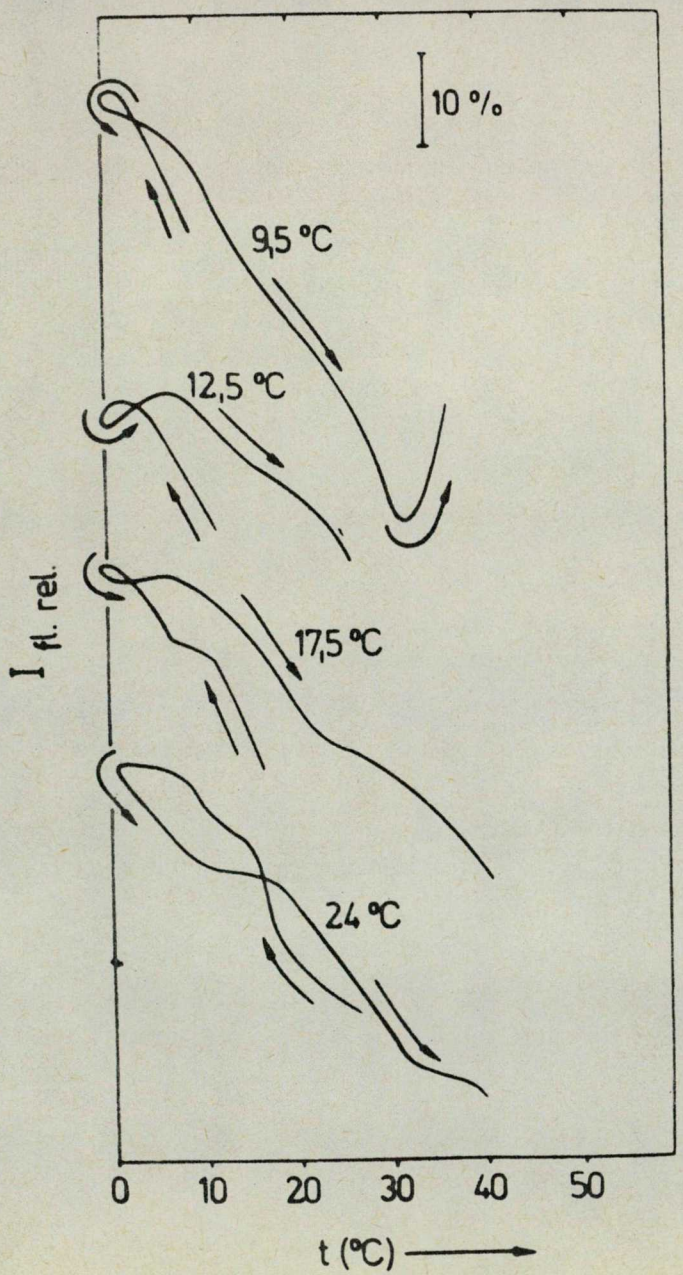
24. ábra
Chlorella alga fluoreszcencia-intenzitásának függése a hőmérséklettől. /A nevelési hőmérséklettől hütve a mintát/

Abban az esetben, ha a nevelési hőmérséklettől kezdve nem emeltük, hanem csökkentettük a hőmérsékletet, a fluoreszcenciaintenzitásnak az emelkedését tapasztaltuk. /24. ábra/ Látható, hogy 15 °C között a görbe menetében változás állt be. A hütést

követően a membrán részben irreverzibilis változást szenved, amit az is mutat, hogy a fluoreszcenciaintenzitás értékei nem azonosak a hütéskor mértekkel.

V. Táblázat

λ/nm / t/°C/	41,o	44,8	49,2	54,5	58,9	64,6	57,3	46,6
678	5o,o2	53,o9	55,24	56,14	53,51	35,49	53,49	55,7o
68o	59,9o	58,16	58,27	59,95	55,47	51,52	54,12	53,16
682	65,71	61,88	61,67	56,67	56,89	35,o4	5o,94	49,42
684	67,12	66,18	65,74	58,22	57,61	33,o6	47,47	47,26
686	63,29	66,96	66,76	55,75	55,2o	32,34	42,71	46,7o

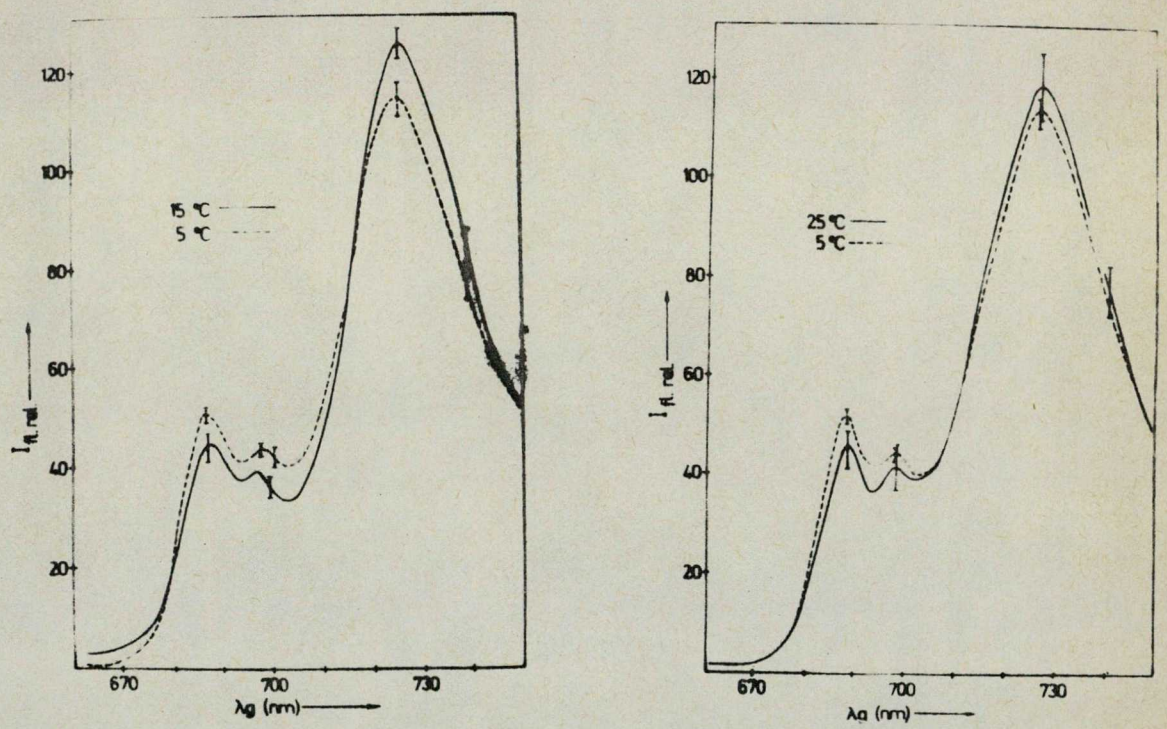


Érdemes megjegyezni, hogy a hőmérséklet emelkedésével a fluoreszcencia maxumumhely a kisebb hullámhosszak felé tolódik el. Ezt az V. táblázatból láthatjuk. Ez a hipszokróm eltolódás arra utal hogy különbség van a különböző hőmérsékleten nevelt algák klorofill-protein komplexének szerkezete között. A különbség mibenlétének feltárása további vizsgálatokat igényel. /Az V. táblázat adatai a 3,7 °C-on nevelt algára vonatkoznak. Hasonló figyelhető meg a kontrolnál is, de kisebb intervallumban./

25. ábra
Különböző hőmérsékleten nevelt C. pyrenoidosa fluoreszcenciaintenzitásának függése a hőmérséklettől.

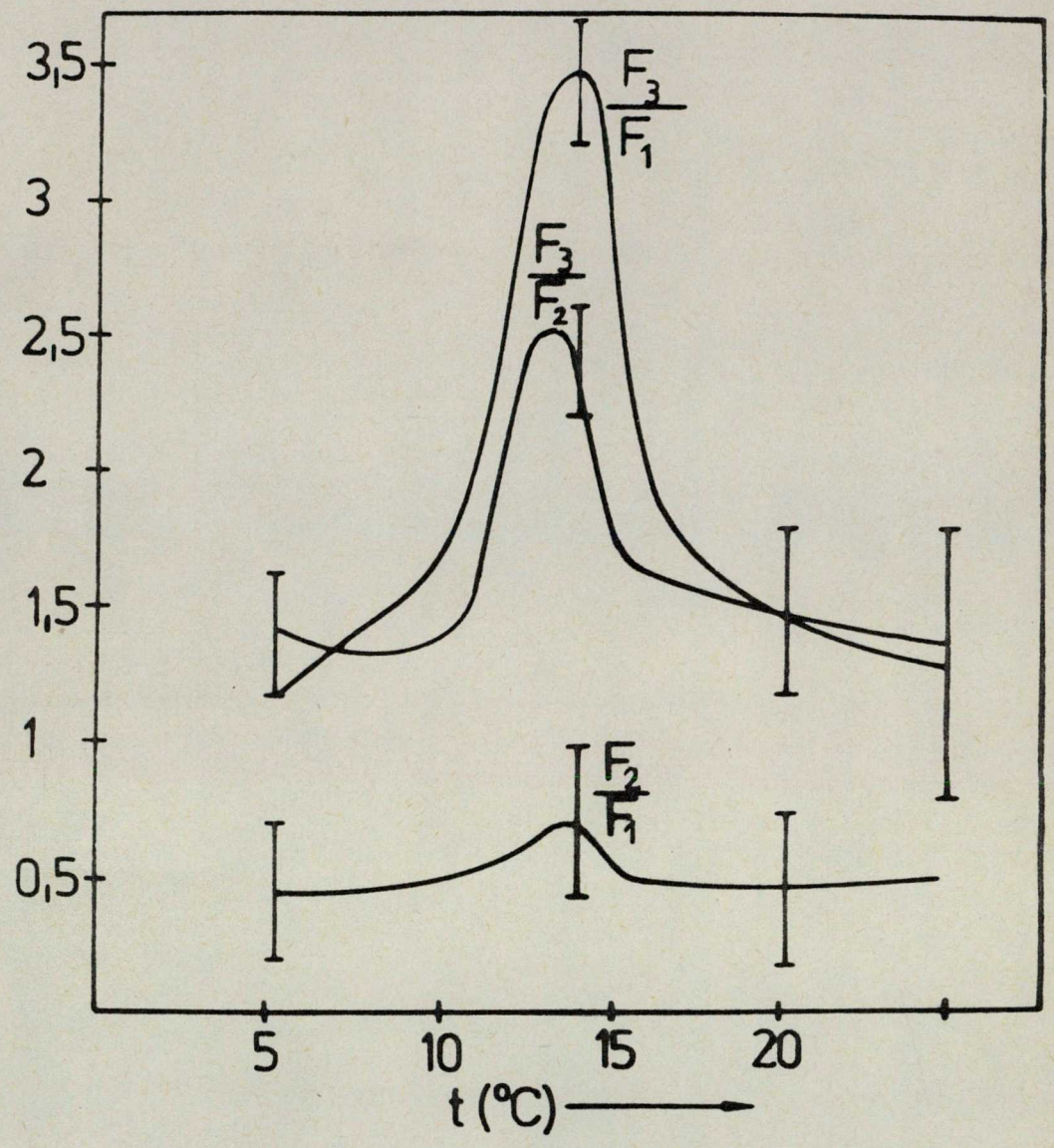
A 23. **ábrán** a különböző hőmérsékleten nevelt Chlorella pyrenoidosa sejtek hőmérséklet-fluoreszcenciaintenzitás görbéit láthatjuk. Jól megfigyelhető, hogy a hőmérséklet csökkenésével /a hütést minden esetben a nevelési hőmérséklettől kezdtük/ a fluoreszcenciaintenzitás igen intenziven emelkedik. Minél alacsonabb a nevelési hőmérséklet, annál intenzivebb a fluoreszcencia /annál magasabbról indulnak a görbék. Ez talán magyarázható azzal, hogy alacsonyabb hőmérsékleten az elektrontranszport gátoltabb, igy a befogott fényenergia fölös részét fluoreszcencia formájában adja le a rendszer.

A fénygyüjtő pigmentek és a fotoszisztémák mennyiségi és energiaátadási viszonyairól a mélyhőmérsékletü fluoreszcenciaszinképek tanulmányozásával kaphatunk képet. Mint korábban emlitettem, a Chlorella pyrenoidosa mélyhőmérsékletü fluoreszcenciaspektruma három komponensre bomlik. Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a három komponens intenzitasának aránya függ a nevelési hőmérséklettől. /26. ábra/



26. ábra

Különböző hőmérsékleten nevelt Chlorella pyrenoidosa alga alacsony hőmérsékletü fluoreszcenciaintenzitásainak aránya



27. ábra

Különböző hőmérsékleten nevelt Chlorella pyrenoidosa sejtek alacsonyhőmérsékletü fluoreszcencia komponenseinek intenzitásviszonyai

Szemléletesebben látható ez a változás, ha az F_3/F_1, F_3/F_2, F_2/F_1 értékeket külön ábrázoljuk a nevelési hőmérséklet függvényében.

Jól látható,hogy mindhárom görbe lefutása hasonló : 13-14°C-nál egy határozott csúcs található.A legnagyobb csúcs az F_3/F_1 értékeknél van,mig az F_2/F_1 arányok alig változnak.

Mint Murata és munkatársai megállapitották, a 14°C körüli érték a kloroplasztisz membránban levő telítetlen zsírsavak fázisátmenetét jellemzi./Ono,Murata,1981./ Azért is kell hangsulyoznunk ezt,mert a korábbi irodalmi adatok ezen a hőmérsékleten nem mutattak ki jellemző változást.Az alacsonyhőmérsékletü fluoreszcenciaszínképek eredményei jól egybeesnek a szobahőmérsékletü fluoreszcencia eredményeivel. Más fotoszintetizáló rendszereknél is megfigyelhető ezen a hőmérsékleten jelentős változás. Egyértelmüen kijelenthetjük,hogy ez a hőmérséklet nem lehet közönbös a Chlorella alga életmüködése szempontjából.

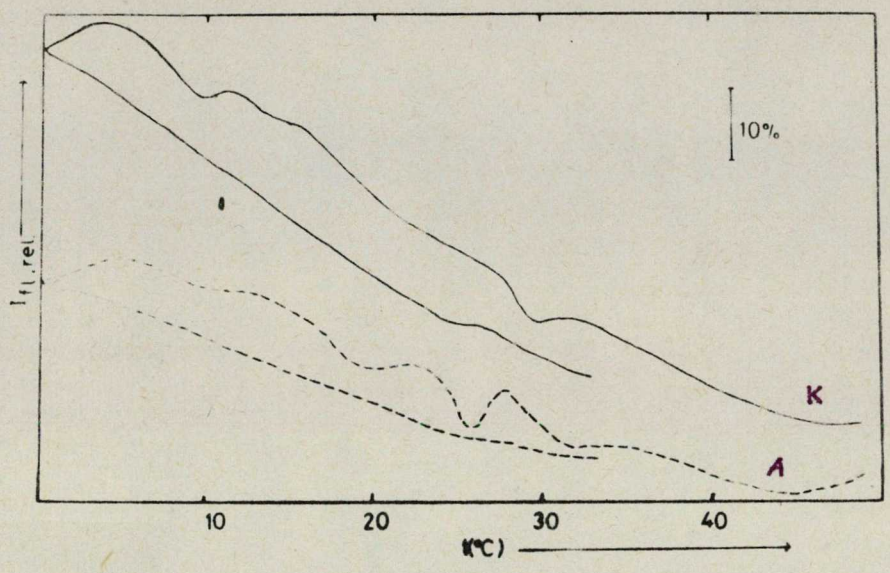
Ez a hőmérsékleti hatás a fotokémiai rendszerek müködését azok eltérő membránbeli lokalizációja révén közvetlenül is befolyásolhatja,bár nem kizárólagosan.Befolyásolhatja közvetetten is a PS-2 —— PS-1 energiaelosztási folyamatok befolyásolásával is.Ezek szerint a kloroplasztisz membránban levő telítetlen zsírsavak hatékonyan tudnék szabályozni a két fotorendszer közötti energiamegoszlást. E "kuplungmechanizmus" részletei még koránt sem tisztázottak,így további vizsgálatokat kívánnak.

6.2.Klorfill-a in vivo fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése lipidmetabolizmust befolyásoló szerekkel kezelt algákban

Cerulenin hatása Chlorella pyrenoidosa fluoreszcencia hőmérsékletfüggésére

Mint azt korábban kimutatták a cerulenin irreverzibilisen inaktiválja a zsírsavszintézis kondenzáló enzimét.Hatása azonban ennél összetettebb,mivel befolyásolja a telitett/telítetlen zsírsavak arányát.Bizonyos zsírsavak mennyiségét növeli,másokét csökkenti/Herczeg T.és mtsai,1979./ Nő a telítetlen zsírsavak aránya.Közel kétszeresre nőtt a 18:3 és majdnem tizszeresre csökkent a 18:2 aránya.A telítetlen zsírsavak arányának növekedése a membrán fluiditásának növekedését okozhatja.Hasonlóképpen jelentős fluiditásnövekedést okozhat a 18:3 1/1o %-ról 1/5 %-ra növekedése is.Nem meglepő teháta fluoreszeenciaintenzitás hőmérsékletfüggésére kapott eredmény,amely alátámasztja az eddig tapasztaltakat.

A 28. ábrán jól látható, hogy a kontrol mintánál 28 °C körül megfigyelhető váll 3 napos kezelés hatására az alacsonyabb hőmérséklet felé tolódik el, tehát a membrán fluidabbá válik. Ez a hatás már egy napos kezelés hatására is megfigyelhető, bár nem ilyen jelentősen. Megfigyelhető az is, hogy a görbe menetében más hőmérsékleti értékeknél is változások vannak. Ez arra utal, hogy a cerulenin más membránalkotók mennyiségi viszonyait is jelentősen módositja.



28. ábra

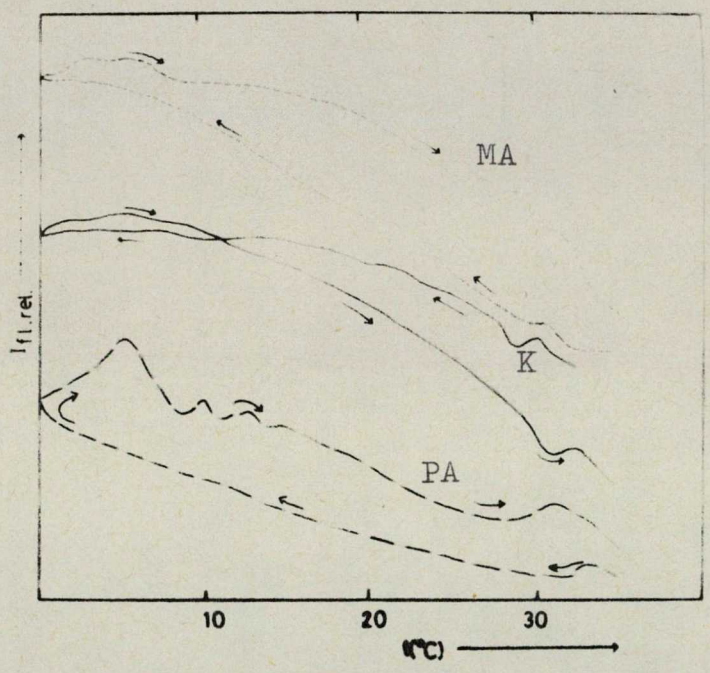
Cerulenin kezelt Chlorella pyrenoidosa alga /A/ fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése

Fenetilalkohol hatása a Chlorella pyrenoidosa alga fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggésére

Mint azt Nozawa és munkatársai, valamint White és munkatársai vizsgálataiból láthatjuk, /Nozawa és mtársai, 1979., White és mtársai, 1964./ a fenetilalkohol hatása nem minden szervezetben hasonló. Más hatást találhatunk például a Tetrahymena pyriformisnál és mást a Chlorella pyrenoidosánál. Mig az előzőben a 18:1 és a 18:2 növekedett, addig az utóbbinál ezen telitetlen savak csökkenését tapasztalták. Növekszik viszont a palmitolain mennyisége, és hasonlóképpen a foszfolipidtartalom is jelentősen emelkedik. Egyes adatok szerint a

palmitoleinsav /16:1/ csak a foszfatidil-glicerolt észteresiti. A zsirsavak mennyisége általában növekszik a szer hatására. /Gyulai G., 1984./

Méréseinkből láthatjuk /29. ábra/, hogy a Fa-os kezelés nem vonja maga után a szerkezet jelentős változását. A kontroléhoz hasonló lefutásu görbét kapunk, annál azonban erőteljesebb, kifejezettebb vállakkal. Igazolja ez azokat a méréseket, amelyeket Gyulai Gábor végzett 1984-ben /Gyulai G., 1984./ Tisztázásra vár még az, hogy a kontrolnál 5-15 °C körüli tartományban megjelenő három váll helyett a Fa-os kezelés hatására a mintákban négy váll jelenik meg.



29. ábra

Fenetilalkohollal és metronidazollal kezelt Chlorella pyrenoidosa alga fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése

Metronidazol hatása a Chlorella pyrenoidosa alga fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggésére

Mint azt Harwood és mtsai kimutatták /Harwood és mtsai, 1980./ a metronidazol gátolja a ^{14}C-acetat beépülését, s ezzel a módszerrel kimutatták a zsirsavszintézist gátló hatását.

Gyulai Gábor mérései alapján feltételezhető, hogy a metronidazol csökkenti a zsirsavak mennyiségét. /Gyulai G., 1984./ /Érdekes módon azonos mértékben, de azok megoszlása az egyes lipidekben eltérő lehet./ Meglepő, hogy a foszfolipidtartalom változatlan maradt. Jelentős változás következett be a galaktolipidek mennyiségében is.

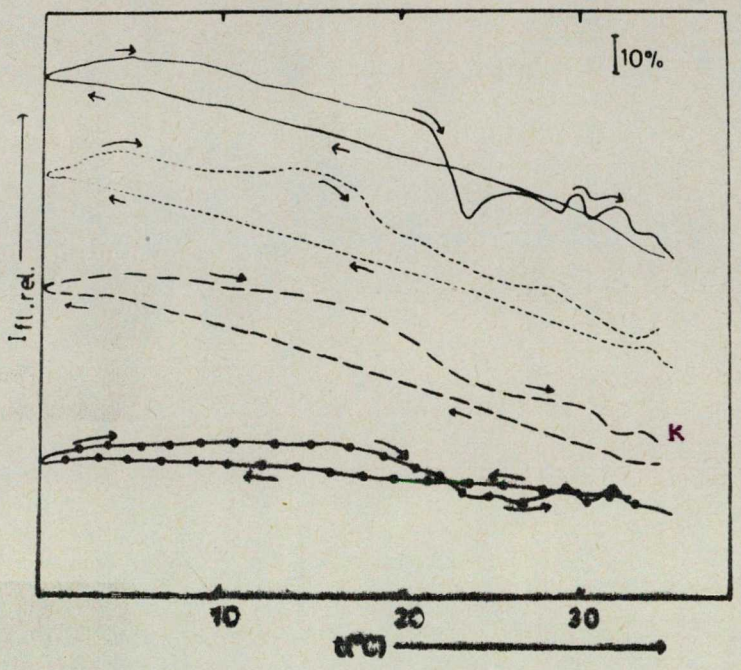
Az, hogy a metronidazol specifikus hatással kisebb mértékben rendelkezik, láthatómméréseinkből is. A 29. ábrán láthatjuk, hogy a gátlószerrel kezelt alga fluoreszcenciaintenzitás-hőmérséklet görbéje a kontroléhoz hasonló lefutásu. Érdekes, hogy a kontrolnál látható 5-15 °C körüli vállak nagy mértékben kisimulnak.

Piridazinon herbicidek hatása Chlorella pyrenoidosa sejtek fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggésére

Méréseink, mint azt a 3o. ábrán is láthatjuk, megerősitik azt a tényt, miszerint a SAN 67o6 és a SAN 9789 kódszámu vegyületekletek hatása egymáshoz közelálló, mig a SAN 9785 kódszámu vegyülettel kezelt alga tulajdonságai kevésbé térnek el a kontrolétól. /Érthető ez, hiszen mint korábban emlitettem, az előző kettő a növények intermedier anyagcseréjében szoros kapcsolatban van egymással./

A fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggésében az utóbbi vegyületnél a kontroléhoz hasonló lefutásu görbét kapunk, mig az előző két vegyületnél a görbe lefutása egymáshoz hasonló, de a kontrolétól jelentősen eltér. Az, hogy a kontrolnál 3o °C körül megfigyelhető váll mintegy lo °C-kal alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódik el, mindenképpen fluidabb szerkezetre utal. Ez nem irható egyértelmüen a telitett/telitetlen zsirsavak arányának változására, hiszen azt mindhárom szer növeli /Gyulai G., 1984./ A zsirsavak lipidekben történő megoszlását mindhárom szer igen eltérően befolyásolja, igy ebből egyértelmü következtetést a membrán fluiditására vonatkozóan levonni nem lehet. Csak a zsirsavösszetételre gondolva egyébként is hamis következtetésre juthatnánk, hiszen a membrán fluiditását egyéb tényezők is befolyásolják/pl. fehérjék jelenléte, karotenoidoknak is jelentős szerepük lehet.

amelyek a vizsgált rendszerekben is eltérőek lehettek. Jól ismert például az, hogy a SAN 67o6 és a SAN 9789 kódszámu vegyületek jelentősen befolyásolják a karotinoidok bioszintézisét, ezek tehát ezen hatásukban hasonlítanak egymásra, mig a SAN 9785 ezt nem befolyasolja. /Meg kell jegyeznünk, hogy Herczeg Tamás és mtsai vizsgálatai szerint algában a karotinoidok mennyiségi megoszlásában ezen vegyszerekkel kezelt mintákban eltérést nem tapasztaltak /Herczeg T. és mtsai, 198o./



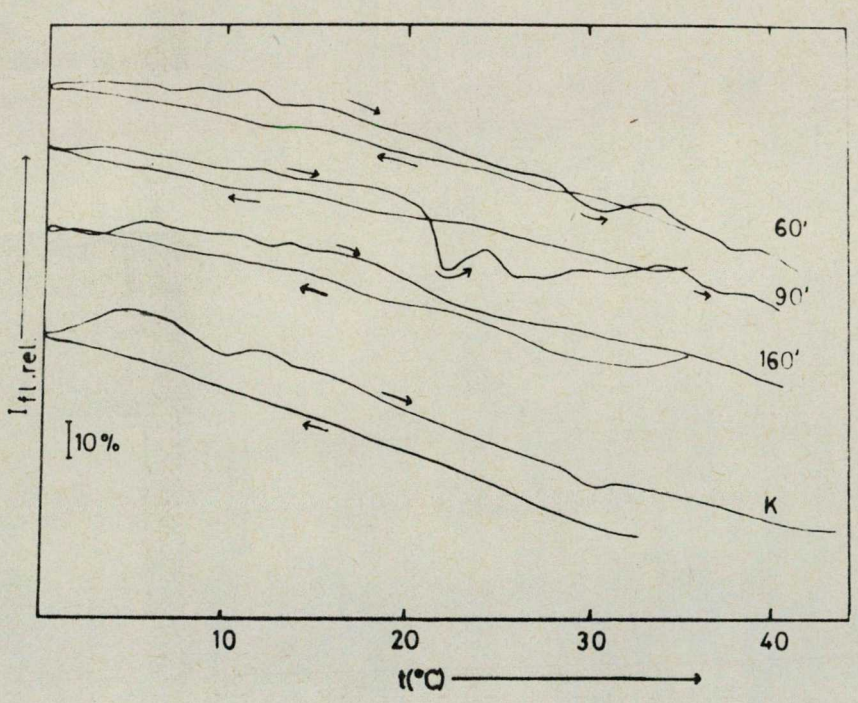
3o. ábra

Piridazinon herbicidekkel kezelt Chlorella pyrenoidosa alga fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése
/ ——— SAN 67o6, ····· SAN 9785, o-o-o-o-o SAN 9789/

Linolénsav hatása Chlorella pyrenoidosa alga fluoreszcenciaintenzitas hőmérsékletfüggésére

Mint korábban már emlitettem, a telitett/telitetlen zsirsavak aránya jelentősen befolyásolja a membránfluiditást. Ezen zsirsavak aranya változhat az élőlények életmüködéseinek megváltozásával /környezethez való alkalmazkodás, membránszerkezetmódositó - zsirsavszintézist befolyásoló szerek hatására/, de megváltozhat

zsirsavaknak mesterségesen a membránba való bejuttatásával is. kézenfekvő tehát az a gondolat, hogy ha in vivo rendszerekhez exogén zsirsavakat adagolunk, akkor az behatolva az élő szervezet membránrendszerébe, megváltoztathatja annak fizikai-kémiai állapotát . Amennyiben sikerülne kimérnünk azt, hogy a sztearinsav hatására a fázisátalakulás a magasabb, a linolénsav hatására az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódik el, ugy a fenti elképzelés igazolódna. Tekintettel arra, hogy a vizsgált rendszerekben a linolénsav játszik lényegesebb szerepet, igy annak módositásától várhatunk jelentősebb eredményt, méréseink során a linolénsavval inkubált Chlorella sejtekben mértük a fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggését. A görbék menetében a 28 °C körüli váll az inkubációs idő előrehaladtával fokozatosan az alacsonyabb hőmérséklet felé tolódik el, ami a fluiditás növekedésének a jele /31. ábra/.



31. ábra

Exogén uton adagolt linolénsav hatása Chlorella sejtek fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggésére / a görbék mellett az inkubációs idő látható/

6.3. Klorofill-a fluoreszcenciaintenzitás hőmérsékletfüggése Chlamydomonas reinchardii yellow mutánsaiban

Mint korábban emlitettem, a Chlamydomonas reinchardii alga azért lehet érdekes ezen mérések szempontjából, mert ismertek a különböző mutáns tipusok polipeptidjei, és strukturális szempontok szerint jól definiált csoportok alakithatók ki az egyes tipusokból /Gyurján, 1983./ Az eddig elvégzett vizsgálatokból számunkra a plasztisz szerkezetéről szerzett ismeretek a legjelentősebbek. Ez alapján a yellow mutánsok az alábbi csoportokba sorolhatók:

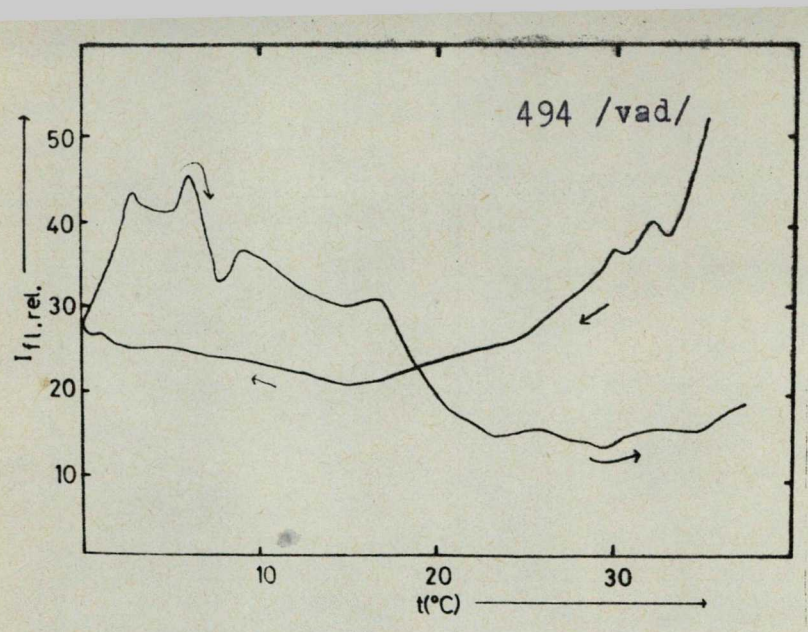
1./ Fényen nevelve nagy mértékben a vadhoz hasonló szerkezettel rendelkeznek. Sötétben a plasztisz gyengén fejlett belső membránrendszerrel rendelkezik. A többé-kevésbé párhuzamos lefutásu lamellák főleg az envelope közelében helyezkednek el. Belül csak igen rövid membránképletek találhatók.
Ide tartoznak: y-48, y-49, y-28.

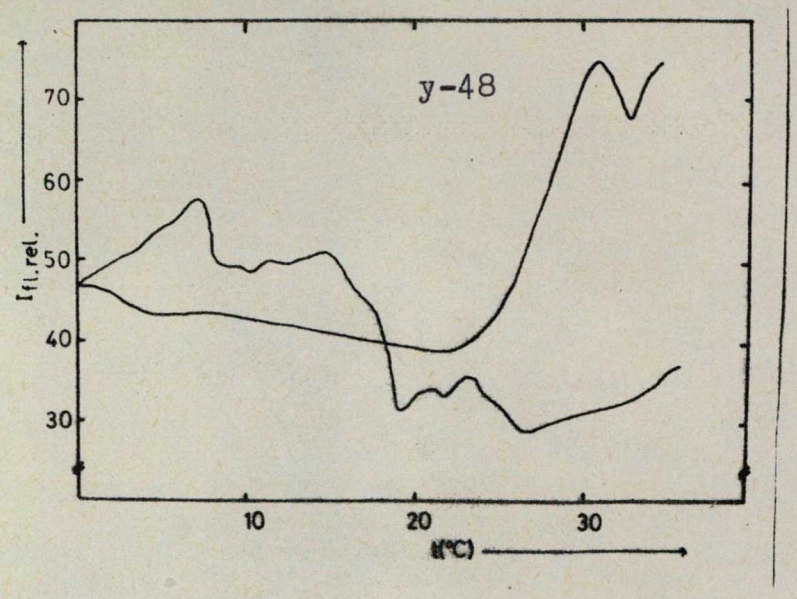
2a./ Fényen nevelve a magasabbrendüekhez hasonló plasztisszerkezet, sötétben egyszerü tilakoidok jelennek meg, az előzőnél viszonylag több a lamella. /y-27/

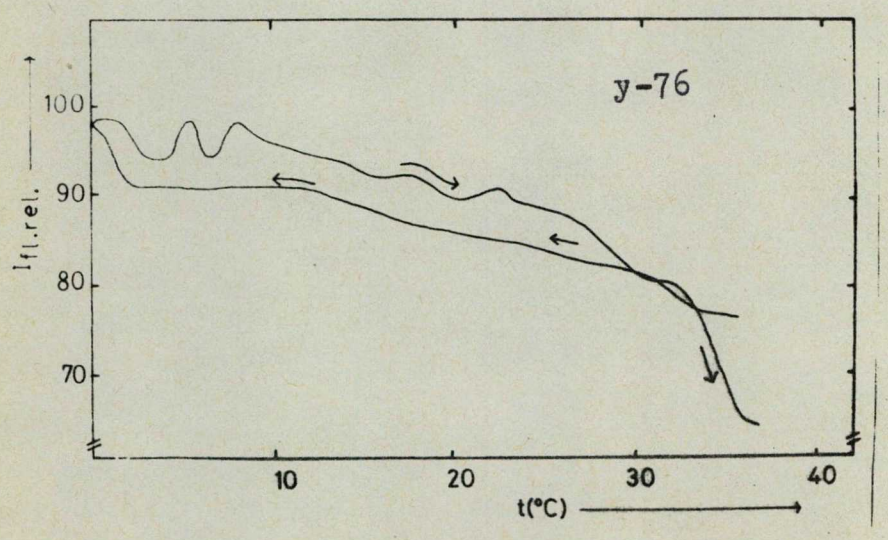
2b./ Nem teljesen yellow mutáns /fenotipusa sötétben sárgászöld/. Fényen nagy mértékü görbült gránumok. Sötétben membránok és néhány gránum is megfigyelhető. /y-76/

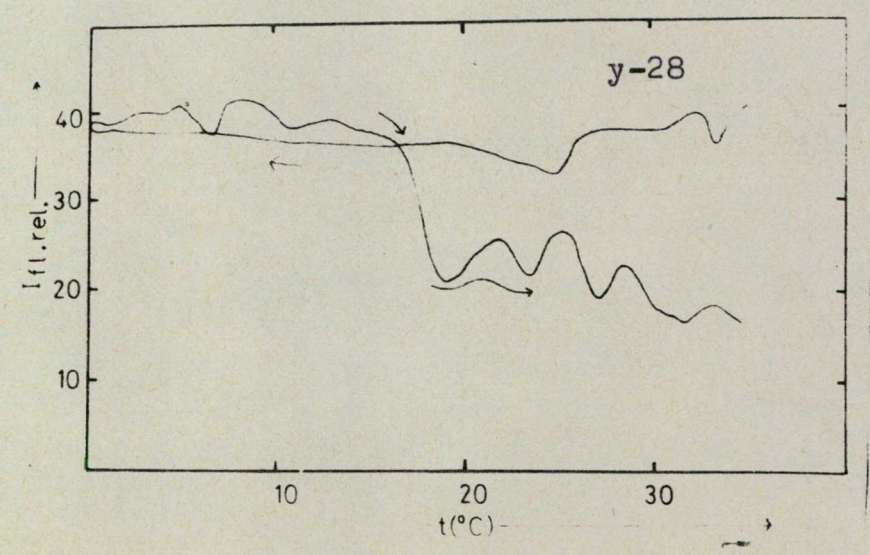
Az alacsonyhőmérsékletü fluoreszcenciaspektrumok is azt mutatják, hogy sötétben az 1 csoport csupán klorofill prekurzorokat tartalmaz, mig az utóbbi kettő rövid hullámhosszon abszorbeáló klorofillformákat tartalmaznak. Ezért ezek átmenetek a yellow és a vad között.

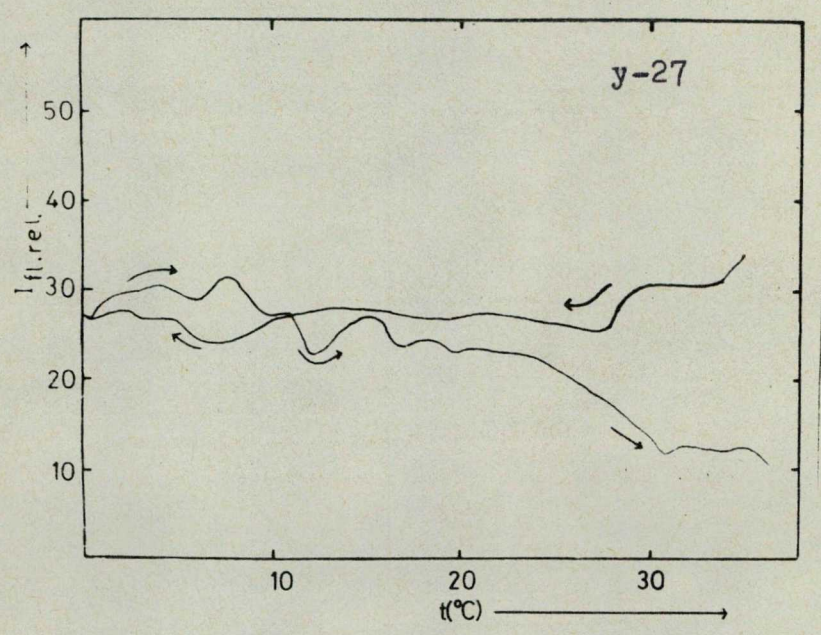
Fázisátmenetméréseink jó összhangban vannak a fenti megállapitásokkal. Jól kivehető különbségeket láthatunk az egyes mutáns tipusoknál, de az azonosságok is szembetünőek. /32. ábra/ Jól megfigyelhetőek mindegyik mintánál a o és 5 ^{o}C között jelentkező vállak, amelyek azonban mintánként jellegzetesen változnak. E tekintetben a legjobban a y-49 ill. y-76, valamint a y-27 ill. y-28 hasonlitanak egymásra. A y-28 valamint a y-48 a fenti csoportositásban egy csoportba sorolhatók, nem meglepő tehát, hogy mindkettőben jól kivehető változás következik be a fluorokróm klorofill mikrokörnyezetében 18 ^{o}C körül.

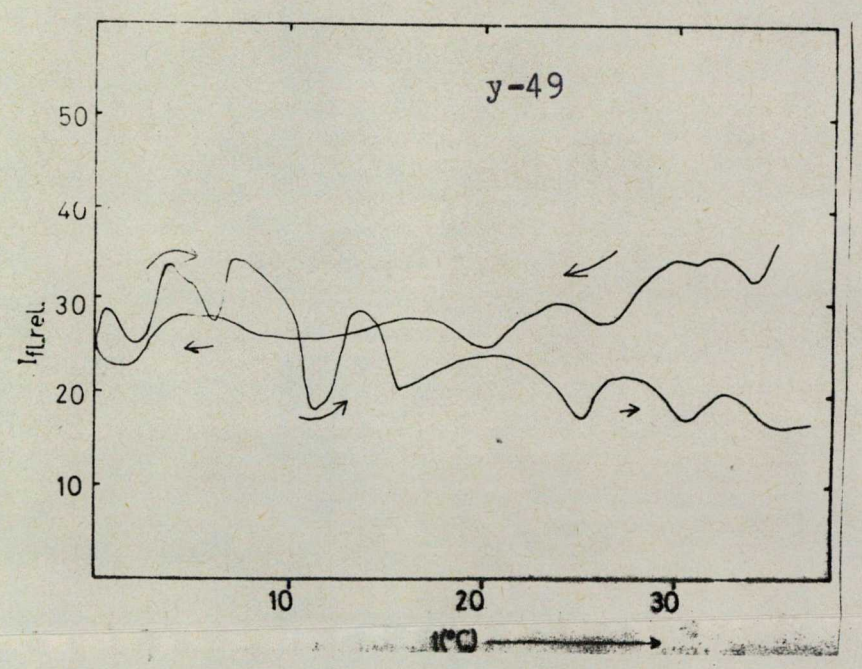












32. ábra

Chlamydomonas reinchardii alga yellow mutánsainak, valamint a 494-es /vad/ törzsnek a klorofill-a sajátfluoreszcenciaintenzitása a hőmérséklet függvényében /10^{-5} M DCMU-val kezelve/

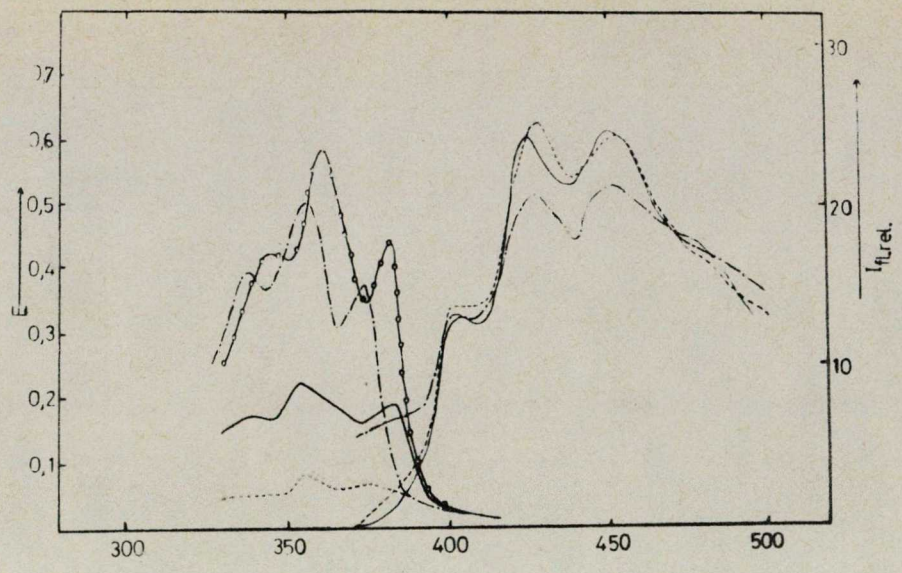
Ebbe a csoportba sorolható még a y-49 is, amelynél szintén megfigyelhető kisebb intenzitáscsökkenés, de ez nem feltünő. Feltünő viszont szintén 18 °C körül a kontrolban előforduló jelentős változás, Igen jelentős intenzitáscsökkenés látható a y-76 mutánsnál 33 °C körüli tartományban. Mindezek a változások a fázisátmenetek tipikus jelei. Az a tény, hogy az utóbbi mintánál a fázisátmenet a magasabb hőmérsékletek felé tolódik el rigidebb membránszerkezetre utal.A nagyobb, fázisátmenetekre utaló változásokon kivül kisebb intenzitásváltozások is megfigyelhetők. Ez azt mutatja, hogy a különböző membránszerkezetek jelentősen módositják a klorofill-a saját fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését. Nem kis szerpük lehet ebben a membránproteineknek is, amelyek hatásának értelmezése további vizsgálatok tárgyát képezheti.

6.4. Az 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién fluoreszkáló jelzőmolekula jellemzése és inkubálási módszreének kidolgozása

A DPH abszorbciós és fluoreszcenciaspektruma három maximummal rendelkező görbe. Az abszorbció mértéke, de a fluoreszcenciaintenzitás is változik az oldószer dielektromos állandójának megváltozásával. Külön figyelnünk kell arra, hogy a maximumhelyek nem változnak ezzel lényegesen, igy a maximumhelyek eltolódásával a molekula környezetének polárosságára nem következtethetünk. /33. ábra/ Érdemes megjegyeznünk, hogy igen intenziv fluoreszcenciát tapasztalunk a reszuszpendáló közegben is. Mint korábban emlitettem, a molekula igen magas extinkciós koefficiense, valamint az igen magas kvantumhatásfok lehetővé teszi, hogy alacsony koncentrációban is alkalmazhassuk. A fluoreszcenciaintenzitás 7,5 $\mu M/dm^3$ koncentráció körül válik közel konstansá a reszuszpendáló közegben. /34. ábra/

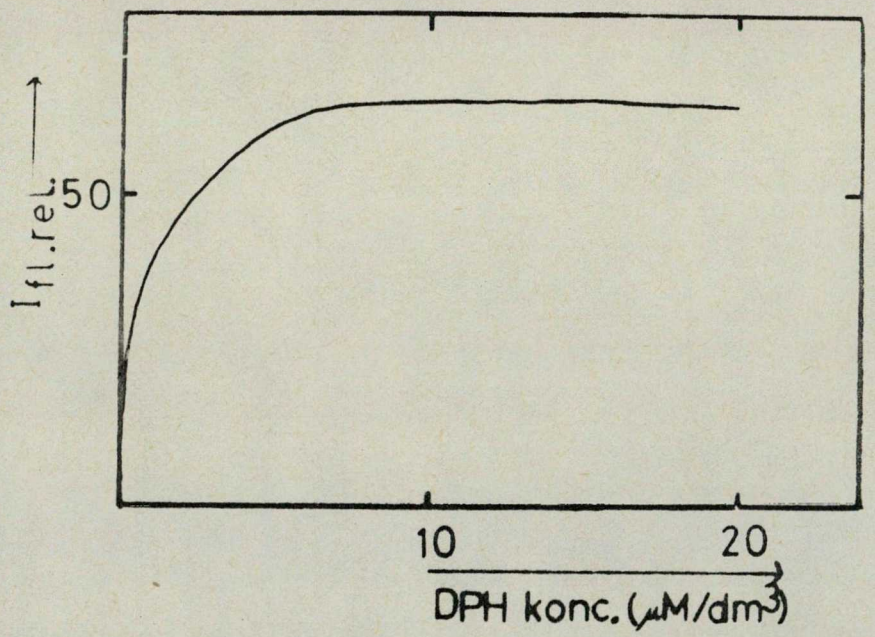
A molekula alkalmazásával kapcsolatban a következő kérdések merülnek fel:

- igazolnunk kell /ki kell mérnünk/ a DPH membránba való beépülését
- mennyi idő alatt épül be a membránba, ill. mi az optimális inkubációs idő
- melyek az optimális koncentrációviszonyok /mi a legoptimálisabb DPH koncentráció, és plasztisz OD/



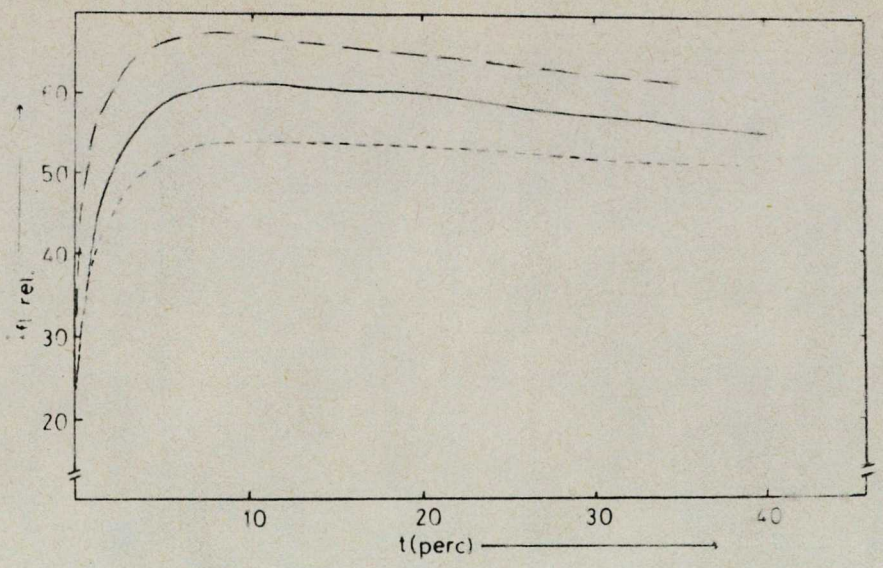
33. ábra

A DPH fluoreszcencia és abszorbciós spektruma különböző oldószerekben / —— éter, ····· aceton, -·-·-·- etanol, o-o-o-o- benzol, λ_g = 365 nm, λ_m = 430 nm,/



34. ábra

A DPH fluoreszcencia koncentrációfüggése a reszuszpendáló közegben

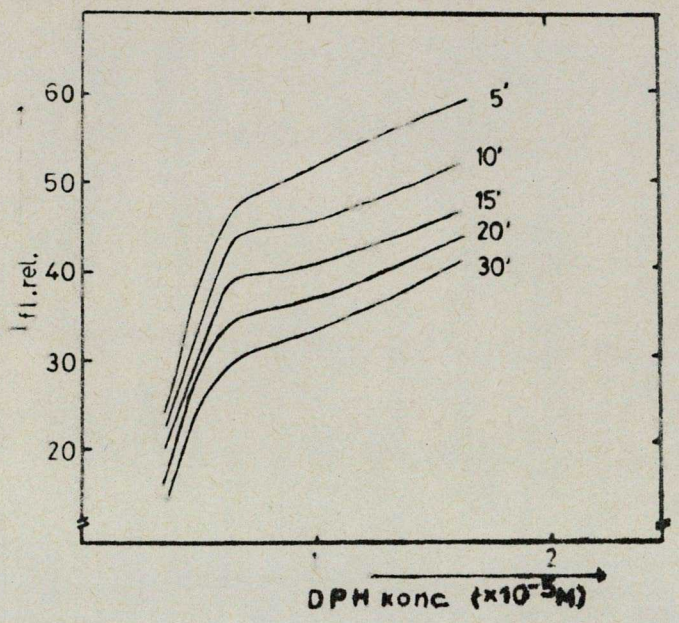


35. ábra

A DPH inkorporációja árpa plasztisz membránba
/ ----- OD: o,11, —— OD: o,4, ····· OD: o,6/

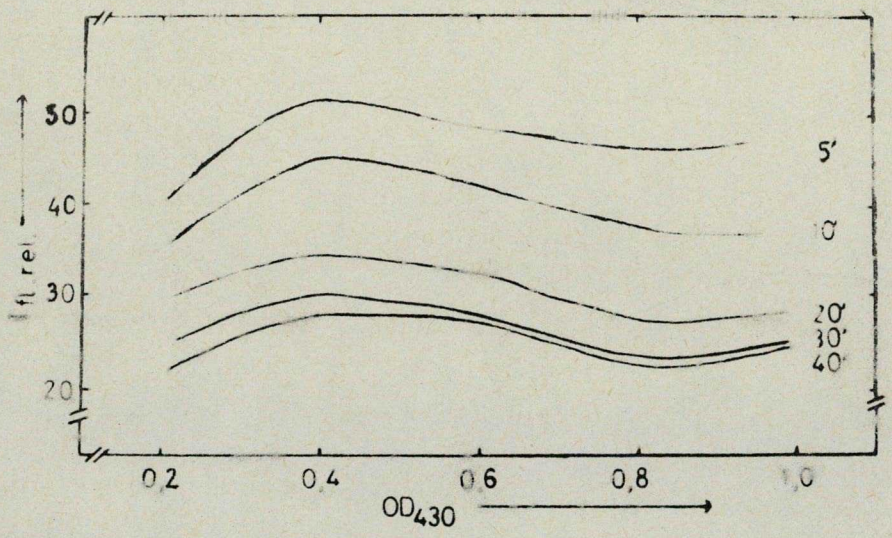
A DPH membránba való beépülése egy időben jól nyomonkövethető folyamat. A kezdeti gyors emelkedés után egy maximum, majd a fluoreszcencia csökkenése következik, rövidesen egy dinamikus egyensuky áll be. Éppen ezért fontos az inkubációs időt pontosan meghatározni, egy mérésnél standardizálni. /35. ábra/ Hasonlóképpen standardizálni kell a DPH és a liposzóma koncentrációt, ill. biológiai rendszereknél a DPH/lipid arányt.

A DPH jelzőmolekula alkalmazását fotoszintetikus membránok vizsgálatára jelentősen nehezíti az a körülmény, hogy /mint azt a 33. ábrán is láthatjuk/ fluoreszcenciája éppen a bban a tartományban van, ahol a fotoszintetikus pigmentek elnyelnek. Ez az észlelést jelentősen lecsökkenti. A méréseink során alkalmazott minták különböző pigmentkoncentrációjuak voltak, igy a különböző abszorbciók kiküszöbölésére a minták optikai denzitását a fluoreszcenciamérés hullámhosszára, 43o nm-re standardizáltuk. Mindezeket figyelembe véve előzetes vizsgálatokat végeztünk a legoptimálisabb koncentrációk megállapitása érdekében. A mérések eredményét a 36. és a 37. ábrán láthatjuk. A két ábrából megállapitható az, hogy a legoptimálisabb a o,4 optikai denzitásu /43o nm/ plasztisz szuszpenzió, valamint a 7,5 μM/ dm^3 koncentrációban alkalmazott DPH. Ez még viszonylag magas fluoreszcenci-



36. ábra

DPH inkorporáció koncentrációfüggése 0,4 plasztisz $OD_{430\ nm}$ esetén különböző inkubációs idők mellet



37. ábra

DPH inkorporáció függése a plasztisz optikai denzitásától /az alkalmazott DPH koncentráció 7,5 μM/

ciaértéket ad, és a reabszorbció még nem jelentős.

6.5. Zsirsavszintézist gátló szerek árpa kloroplasztiszok tilakoidmembránjára gyakorolt hatásának vizsgálata 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién fluoreszkáló jelzőmolekulával

Ceruleninkezelt etiolált levélszegmentek kloroplasztiszmembránjának mikroviszkozitása

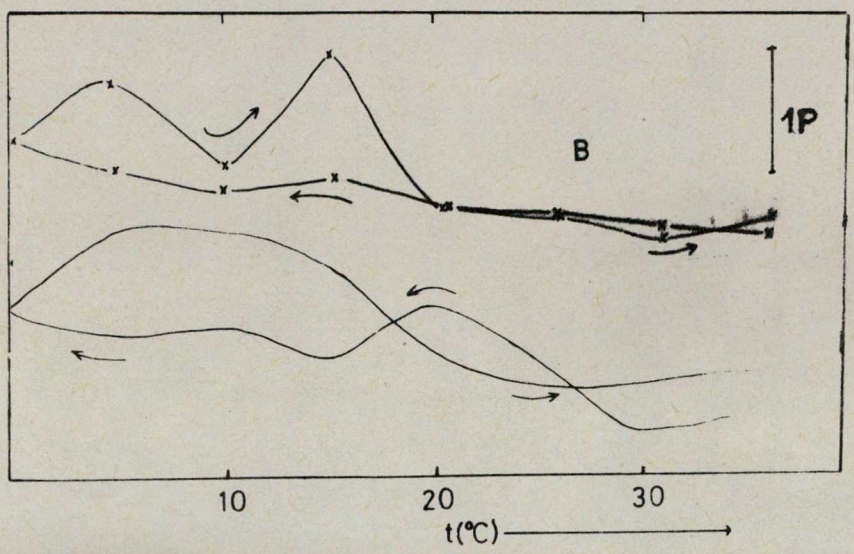
Ezekben a kisérletekben a fotoszintetizáló membránok in vivo szerveződési folyamatairól kapunk információt. Laskay Gábor mérései szerint a cerulenin mind etiolált, mind pedig zölditett levélszegmentekben csökkenti az összlipidek mennyiségét, csökkenti továbbá az MGDG, DGDG és a PL-ek mennyiségét is, de arányuk a konntroléhoz hasonló marad. /Laskay, 1981./ Ezekkel az adatokkal összefüggésbe hozható a mikroviszkozitás hőmérséklettel történő változása is.

15 - 2o ^{o}C között mindkét rendszernél egy élesebb törés figyelhető meg mindkét rendszernél. /38. ábra/ A mikroviszkozitás értékei a ceruleninkezelt rendszernél alacsonyabbak a kontrolénál, ami az összzsirsavak mennyiségének csökkenésével magyarázható.

További vizsgálatokat igényel az, hogy a kontrolnál az 5 ^{o}C körül jelentkező váll kisimul ceruleninkezelés hatására. Összefüggésbe hozható ez azzal, hogy a cerulenin a különböző lipidek zsirsavösszetételére eltérően hat /Laskay, 1981./ Ezek a hatások az in vivo méréseknél összegződve jelentkeznek, igy ezekből konkrét következtetéseket levonni nehéz lenne.

Piridazinon herbicidek hatása etiolált levélszegmentek kloroplasztiszmembránjának mikroviszkozitására

Mint korábban már emlitettem, a biomembránok fizikai-kémiai állapotának meghatározásában döntő mértékben vesz részt a membrán lipid mátrixa, de jelentősen befolyásolja a fehérjék jelenléte, sőt fotoszintetizáló rendszerekben a pigmentek, járulékos pigmentek is.



38. ábra

Ceruleninkezelt etiolált árpa levélszegmentek kloroplasztiszmembránjának mikroviszkozitása a hőmérséklet függvényében / A, ceruleninkezelt; B, komtrol,/

A lipidek szerepének tisztázására alkalmasnak látszanak olyan hatóanyagok, amelyek alkalmasak a növényi membránok, igy a kloroplasztiszmembránok lipidösszetételének és szerkezetének módisitására /pl. a zsirsavláncok elongációját, deszaturációját gátolják/. Laskay Gábor mérései során igazolódott, hogy a piridazinon herbicidek kezelt növényekben módositják a telitetlen zsirsavak részarányát. Mérései során jellegzetes változást mutatott ki mind csirázástól kezdődően kezelt, gyenge fényen nevelt /etiolált/ árpa plasztiszokban, mind pedig etiolált levélszegmentek zölditése során.

A SAN 9785 specifikus módon inhibitora a linolénsav-deszaturáznak, a SAN 6706 részlegesen linolénsav-deszaturázgátló hatásán kivül gátolja a karotinoidok bioszintézisét is. A SAN 9789 csak a karotinoidok bioszintézisét gátolja jelentősen. /Laskay, 1981./

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

Szintén Laskay méréseiből tudjuk azt is, hogy a 16:1, 18:o és 18:1 zsirsavak mennyiségüket tekintve nem játszanak jelentős szerepet a kloroplasztisz felépitésében. A 16:o már nagyobb mennyiségben van jelen, de a kezelés során jelentősen nem változik /csupán az etiolált levélszegmentek SAN 9789-cel kezelt mintáinál növekszik jelentősebben a mennyisége/. Mindezekből érthető, hogy figyelmünket elsősorban a 18:2, ill. 18:3 zsirsavakra, ill. azok arányának változására forditottuk.

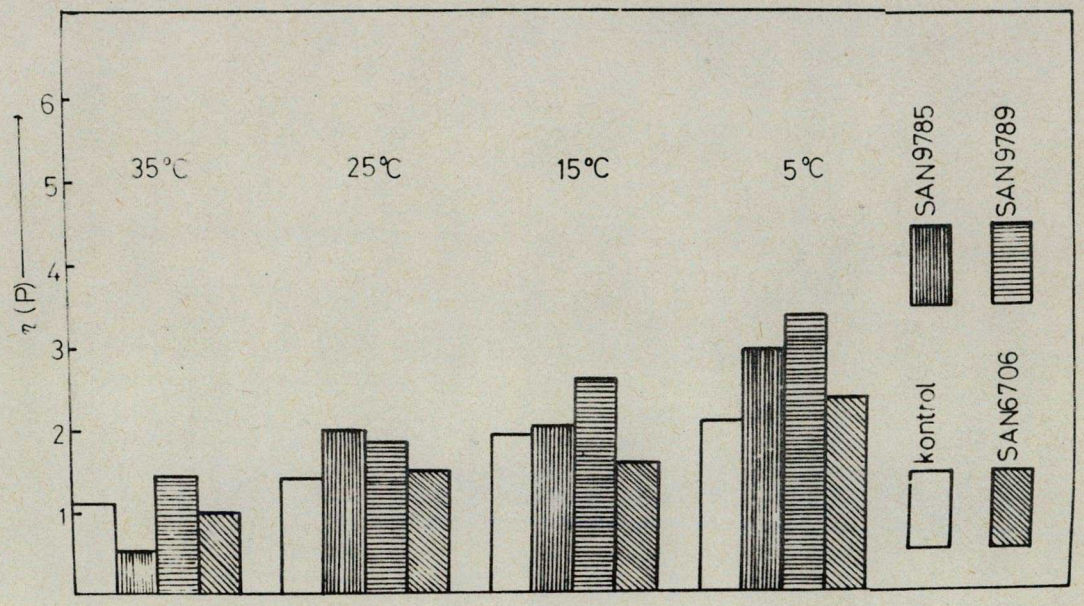
A fenti eredményekkel összefüggésbe hozhatók azok a mérések is, amelyek a membrán mikroviszkozitás értékeit mutatják a hőmérséklet függvényében. /39. és 4o. ábra/ Ezekből adatokból két fontos információt szerezhetünk:

a./ Adott hőmérsékleten megkapjuk a mikroviszkozitás értékét ez különböző minták esetében a membrán fontos paramétere lehet.

b./ A mikroviszkozitás értékeket ábrázolva a hőmérséklet függvényében kisebb nagyobb változásokat figyelhetünk meg. A nagyobb változások minden bizonnyal a fázisátmeneteknek felelnek meg. Korábban láttuk, hogy a fázisátmenet membránszerkezetről adhat fontos információt.

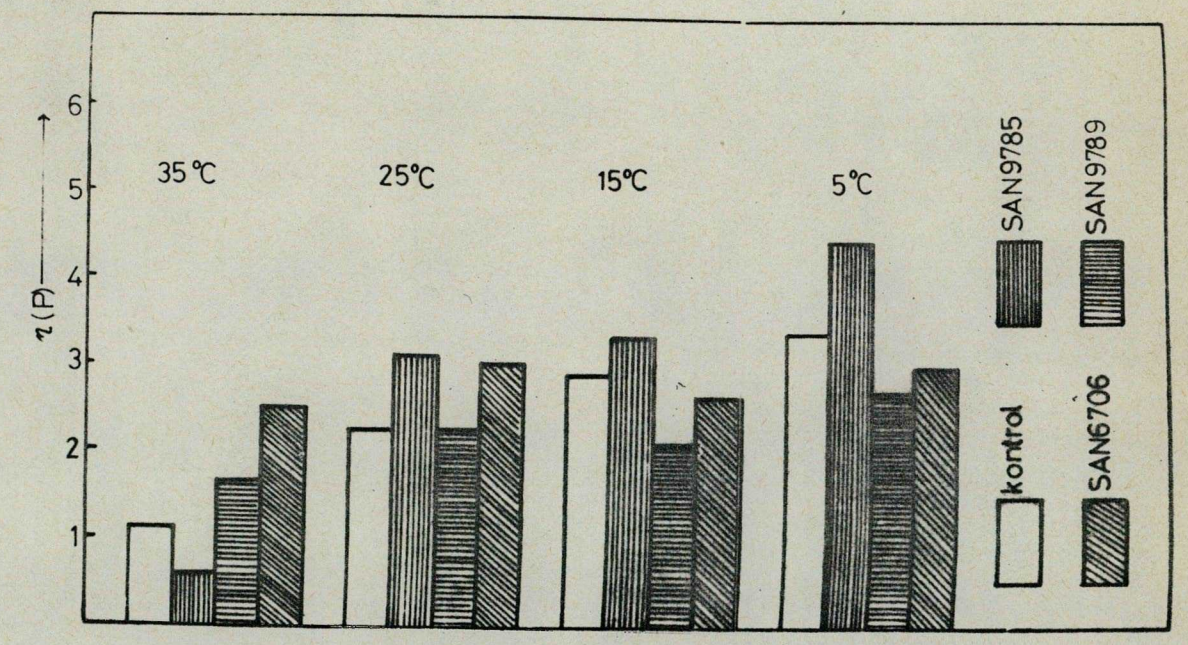
A 39. ábrán a csirázástól kezdődően kezelt, sötétben /lábon/ nevelt árpa növények kloroplastiszainak mikroviszkozitás értékeit láthatjuk 5, 15, 25 és 35 ^{o}C-on. A 4o. ábrán ugyanezeket az értékeket láthatjuk etiolált levélszegmentek zölditése során. A hőmérséklet csökkenésével természetesen a membrán egyre ridegebbé válik mindkét rendszerben. Figyelemre méltó, hogy az etiolált levélszegmentek zölditése során, valamint a lábon nevelt kontrol és SAN 9785 mintáknál az emelkedés fokozatos, mig a SAN 9789 és SAN 67o6 /lábon nevelt/ mintáknál 15 ^{o}C-on enyhe visszaesés figyelhető meg. Érthető ez, hiszen a két utóbbi vegyszer anyagcseréje összefügg.

A lábon nevelt növényeknél kevésbé, de az etiolált levélszegmenteknél különösen megfigyelhető, hogy a kezelt növények mikroviszkozitás értékei magasabbak, mint a kontrolé, ami merevebb strukturát jelez. Azt is megállapithatjuk, hogy a telitett/telitetlen zsirsavak aránya nem egyértelmü meghatározója a membrán



39. ábra

Csirázástól kezdődően kezelt, sötétben nevelt árpanövények kloroplasztiszainak mikroviszkozitás értékei 5, 15, 25, 35 °C-on DPH jelzőmolekula alkalmazásával



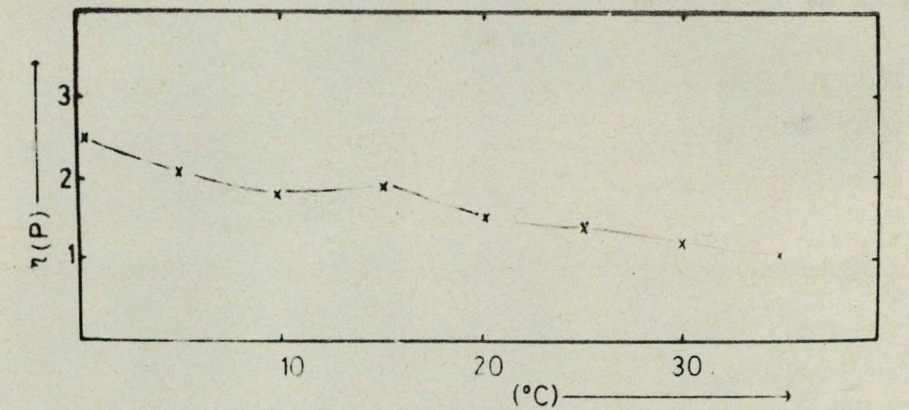
4o. ábra

Etiolált levélszegmentek zöldítése során mért mikroviszkozitás értékek 5, 15, 25 és 35 °C-on DPH jelzőmolekula alkalmazásával

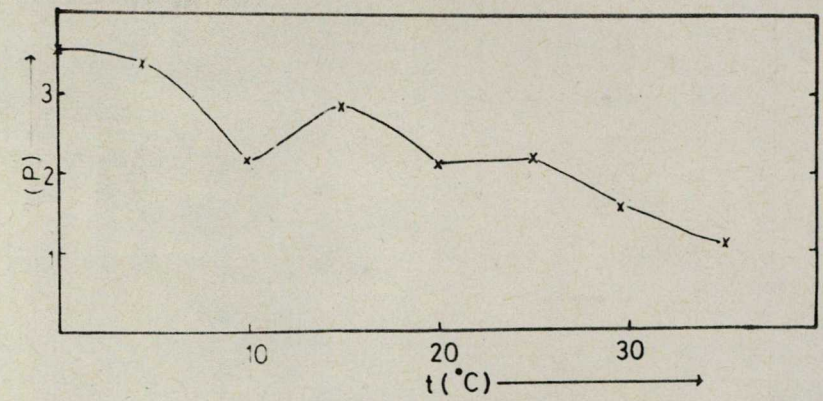
fluid állapotának, hiszen a mikroviszkozitás értékek ezzel nem arányosan változnak. A két nagy mennyiségben jelenlevő zsirsav /18:3 és 18:2/aránya annál jelentősebb. A csirázástól kezdődően kezelt, sötétben nevelt növényeknél ez az érték általában alacsonyabb, s igy a mikroviszkozitás értékek magasabbak. Feltétlenül figyelmet érdemel az a tény, hogy a hőmérséklet csökkenésével legintenzivebben a SAN 9785 lábon nevelt mintái emelkednek. Ennek oka az lehet, hogy a membrán fizikai-kémiai állapotának meghatározásában döntően csak egy zsirsav /18:2/ vesz részt, hiszen ez alkotja a zsirsavállomány majdnem 7o %-át. A 18:3 a kontrolban található 57,8 %-hoz képest csak 9,4 %. /Laskay, 1981./ Korábban láthattuk, hogy a több komponensü rendszerekben a komponensek mintegy nivelláló hatása miatt a változások elmosódottan jelennek meg. Itt ez a nivelláló hatás nem olyan kifelyezett. A IV. táblázat adatai szerint a 18:3 zsirsavak olvadáspontja -lo - -11,3 ^{o}C körül van, igy nyilván ezek koncentrációjának csökkenése a magasabb hőmérsékletek felé tolja el a fázisátalakulást, ill. merevebb strukturát eredményez.

Mindezek ellenére a 18:3/18:2 arány változását se szabad mereven értékelni, más tényezők hatását is számitásba kell vennünk. A SAN 67o6-tal csirázástól kezdődően kezelt növényeknél a linolénsav/linolsav arány szintén igen alacsony. Külön figyelmet érdemel viszont az, hogy a három herbicid közül ez rendelkezik a legdrasztikusabb hatással. Részlegesen linolénsavdeszaturázgátló hatásán kivül gátolja a karotinoidok bioszintézisét is,de hatására a kloroplasztisz fehérjeszintetizáló rendszere is zavart szenvedhet. A fentiekkel magyarázható az, hogy ezzel a vegyszerrel kezelt mintákban nem tapasztalható a többi mintára jellemző változás. Abban az esetben, ha a kezelést nem a csirázástól kezdődően végezzük /zölditett leveleken/, a hőmérséklet csökkenésével a többi mintához hasonlóan lassu emelkedés tapasztalható a mikroviszkozitásban.

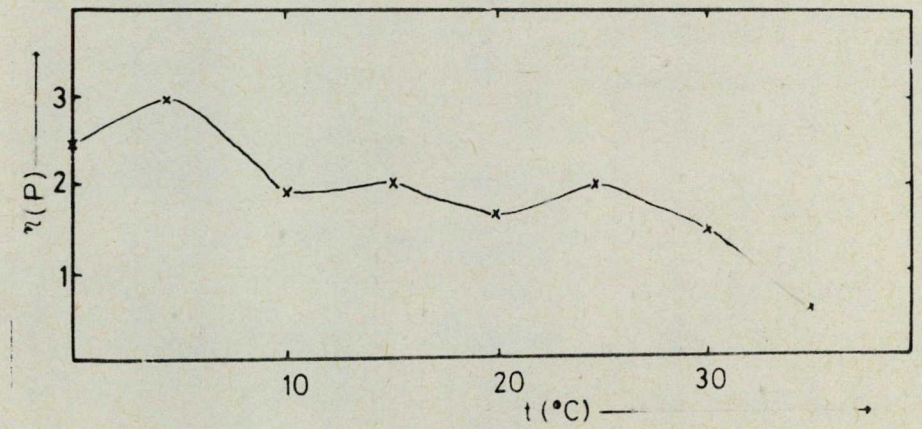
Ha a mikroviszkozitás értékeket a hőmérséklet függvényében ábrázoljuk /mint fentebb már emlitettem/ a fázisátmenetről kaphatunk információt. Erre a 41. ábrán láthatunk néhány példát. Mintáinkban éles átmenetet sehol sem tapasztalhatunk, kisebb-nagyobb változásokat a membrán folyékonyságában megfigyelhetünk. 15 ^{o}C körül mindegyik mintában változás látható.



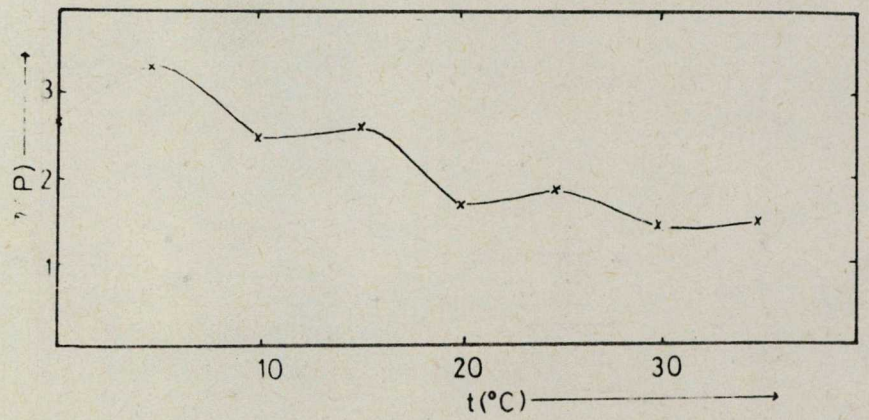
usztatott kontrol



lábon nőtt kontrol



usztatott, SAN 9785-kezelt



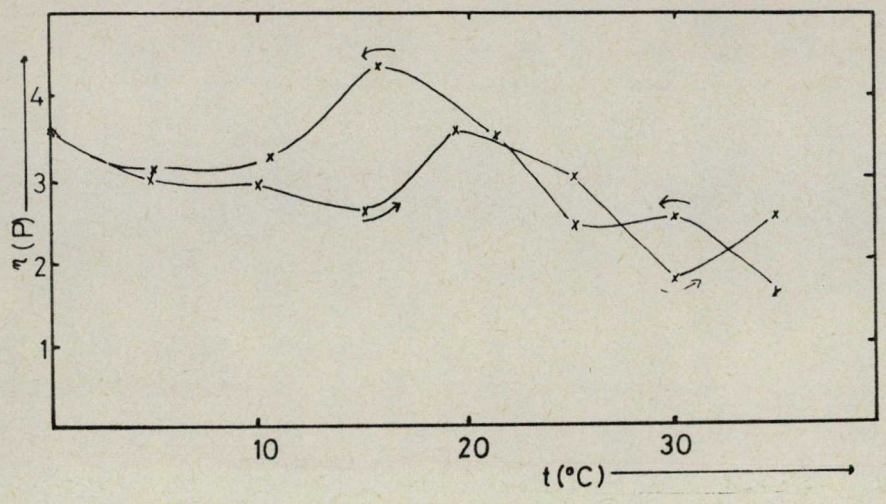
usztatott, SAN 9789-kezelt

41. ábra

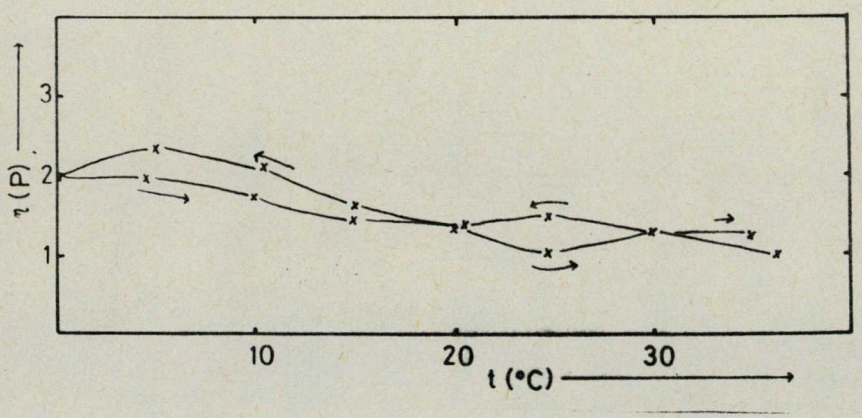
Mikroviszkozitás hőmérsékletfüggése néhány /lábon nőtt és usztatott/ mintánál

Több mintánál is tapasztalható 5 és 25 °C körül is egy-egy maximum. Ezek a hőmérsékletek tehát nem lehetnek közömbösek a növények életmüködései szempontjából.

Megfigyelhető az is, hogy a fütés és a hütés során nem ugyanaz a görbe menete. Ez a hiszterézis a kolloid rendszereknél általános. Hasonlót a többi görbénél is megfigyelhetünk, de legszembetünőbb a SAN 67o6 usztatott és lábon nevelt mintáinál. /42. ábra/



a./



b./

42. ábra

SAN 67o6-tal kezelt árpa plasztiszok tilakoidjainak mikroviszkozitás hőmérsékletfüggése /a. csirázástól kezdődően kezelt növényeknél, b. levélszegmentekből izolált plasztiszoknál/

Feltétlenül meg kell jegyeznünk, hogy ezek a mérések csak közelitő számitásokat tesznek lehetővé. Ennek oka az, hogy a kloroplasztisz rendkivül bonyolult, összetett rendszer. Különböző tipusu, igy különböző mikroviszkozitásu membránrészekből épül fel, tehát a DPH más-más membránrégiók változását jelezheti. Ezek a hatások szuperponálódhatnak is, igy külön-külön tisztán nem érzékelhetők. Ennek ellenére, mint azt a mérések igazolják, a DPH alkalmas a membrán mikroviszkozitásának mérésére és más módszerekkel kiegészitve a fotoszintetikus membránok strukturális és funkcionális jellemzésére.

7. Összefoglalás

A mérési eredmények összegzéseképpen megállapithatjuk, hogy sikerült igazolni több, már eddig is ismert eredményt:

- A zöld algák szobahőmérsékletü fluoreszcenciája egy maximummal rendelkező görbe, amely alacsony hőmérsékleten három jellemző komponensre bomlik.
- Ezen komponensek aránya változhat /pl. a nevelési hőmérséklettel/, amely a fotoszisztémák közötti energiamegoszlástól függ /STATE I.-STATE II./, és ez függ a membrán felépitésétől.
- A fotoszintetikus membrán felépitése / telitett/telitetlen zsirsavak aránya/ függ a nevelési hőmérséklettől, de módositható zsirsavszintézist befolyásoló szerekkel is mint pl. PA, MA, cerulenin és a piridazinon herbicidek.
- A membrán lipidfázisában bekövetkező változások kimutatására fotoszintetizáló szervezeteknél alkalmas a rendszer belső, klorofill-a fluoreszcenciájának mérése.
- In vivo rendszerekben közelitő számitások végezhetők beépitett jelzőmolekula /pl. DPH/ fluoreszcencia-polarizációjának mérésével. Ezekből a mérésekből két fontos információt szerezhetünk:
  - a./ Adott hőmérsékleten mérve a fluoreszcencia polarizációfokát a membrán fluiditásáról kaphatunk felvilágositást.
  - b./ A polarizációfokot /ill. ami ebből számitható, a mikroviszkozitást/ ábrázolva a hőmérséklet függvényében a fázisátmenetről kapunk információt.

A mérési tapasztalatok egy másik csoportjában sikerült fényt deritenünk néhány eddigi megoldásra váró problémára/elméleti és metodikaira egyaránt/, ill. igazolásra került néhány feltevés:

- A Chlorella alga fluoreszcencia-intenzitás hőmérséklet-függésében 12,5 °C körül változások figyelhetők meg. Az eddigi irodalmi adatok ezt a változást még nem igazolták, de az alacsony hőmérsékletü fluoreszcencia szinképek igazolják, hogy ez a hőmérséklet nem lehet közömbös a növény számára. Nem meglepő, hogy ezeket a változásokat eddig nem sikerült egyértelmüen igazolni, hiszen nagyon sok tényezőtől függenek, /pl. a minta"előéletétől"is/
- Igazoltuk, hogy a DPH in vivo rendszerekben történő alkalmazása során a méréseket minden esetben meg kell, hogy előzze a legoptimálisabb inkubálási körülmények /törzsoldat, legoptimálisabb koncentráció, inkubálási körülmények stb./ megkeresése. Mind ezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a DPH alkalmas kloroplasztiszmembránok mikroviszkozitásának mérésére.
- A membrán lipidmatrxát legjelentősebben a PA, cerulenin és a piridazinon herbicidek közül a SAN 6706 módositja.

Végezetül több olyan eredményünk is van, aminek pontos magyarázatához további vizsgálatok szükségesek:

- A telitett/telitetlen zsirsavak aránya mintegy "kuplungként" szabályozza a fotoszisztémák közötti energiamegoszlást.
- A magasabb hőmérsékleten tapasztalható hipszokróm eltolódás.
- A DPH alkalmazásával komoly kritikaként merült fel az, hogy esetleg fehérjékhez is kapcsolódhat. Feltételezhető, mint ezt néhány irodalmi adat is igazolja, hogy az általunk alkalmazott gátlószerek a fotoszintetikus membrán fehérjekomponenseinek változását is érintik. Igaz,hogy más mérési eredményekkel összevetve értelmezhetők a mikroviszkozitás mérések, ezt a tényt nem szabad figyelmen kivül hagynunk.

8. Felhasznált irodalom

1./ Agnolo,P.D.,Rosenfeld,I.S.,Awoya,I.,Omura,S. and Vagelos, P.R. /1973/: Inhibition of fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin. Specific inactivation of -ketoacyl-AcP synthetase, BBA. 326, 155-166.

2./ Anderson, J.M. /1981/: Consequences of spatial separation of Photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher Plant Chloroplasts, FEBS. LETT. 124, 1-1o.

3./ Anderson,B.,Anderson,J.M. /198o/: Lateral heterogeneity in the distribution of Chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts, BBA. 593, 427-44o.

4./ Anderson,J.M.,Anderson,B. /1982/: The architecture of photosinthetic membranes: lateral and transverse organisation, Trends Biochem. Sci. 7, 288-292.

5./ Awoya,I.,Ohno,T.,Ohno,H. and Omura,S. /1975/: Substitution of cellular fatty acids in yeast cells by the antibiotic cerulenin and oxigenous fatty acids, BBA. 4o9, 267-273.

6./ Benah,G. and Konetzka,W.A. /1962/: Inhibition of replication of bacteriophage T2 by phenethyl alcohol, Biochem,Biophys. Res. Com. 8, 4o7-41o.

7./ Benson,A.A. /1971/: Lipids of chloroplasts, In: Structures and Function of Chloroplast, Ed. M.Gibbs, pp. 129-148. Springer, Berlin-Heidelberg-New York

8./ Brody,S.S.,Barber,J.,Tredwell,C. /1981/: Effects of linolenic Acid on the Spectral Properties and Picosecond Fluorescence of Pea Chloroplasts, Z.Naturforsch. 36, 1o21-1o24.

9./ Chapman,D. /1975/: Phase transitions and fluiditi characteristics of lipids and cell membranes, Q. Rev. Biophys. 8. 185-235.

1o./ Chapman,D.,Urbina,I. and Keough,K.M. /1974/: Biomembran phase transitions studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry, J. Biol. Chem. 249, 2512-2521.

11./ Chapman,D. and Quinn,P.I. /1976/: The control of cell membrane fluidity by biochemical and catalytic hydrogenation process, Chem. Phys. Lipids, 17, 363-372.

12./ Chen, C.H. and Bens, D.S. /198o/: Thermotropic Properties of Thermophilic, Mesophilic and Psicrophilic Blue-green algae, Plant. Physiol. 66, 596-599.

13./ Cherry, R.J. /1979/: Rotational and lateral diffusion of membrane proteins, BBA. 559, 289.

14./ Cogan, U., Shinitzky, M,, Weber,G. and Nishida,T. /1973/: Microviscosity and Order in the Hydricarbon Region of Phospholipid and Phospholipid-Cholesterol Dispersion Determined With Fluorescent Probes, Biochemistry, 12, 521-527.

15./ Colbow, K. /1973/: BBA. 314, 32o-327/

16./ Dale, R.E. Chen, L.A. and Brand, L. /1977/: Rotational Relaxation of tha "Microviscosity" Probe Diphenylhexatriene in Praffin oil and Egg Lecithin Vesicles, J. Biol. Chem. 252, 75oo-751o.

17./ Edwards, D.I., Mathison, G.E. and Platt, D.J. /1974/: Metronidasol- an antimicrobial drug wich inhibits photosynthesis, Z. Pflanzenphysiol. 71, 424-427.

18./ Farkas,G. /1978/: Növényi biokémia, I. Fotoszintézis, 1-88. Akadémiai Kiadó Bp. 1978.

19./ Ford, R., and Barber, J. /1983/: Incorporation of sterol into chloroplast thylakoid membranes and its effects on fluidity and function, Planta, 158, 35-41.

2o./ Ford, R.C. and Barber, J. /198o/: The use of Diphenyl Hexatriene to monitor the Fluidity of the Thylakoid Membrane, Photobiochem. Photophys. 1, 263-27o.

21./ Ford, Chapman, Barber, Cox, /1982/: Fluorescens Polarization and spin labell studies of the fluiditi of stromal and granal chloroplast membranes, BBA. 681, 145-151.

22./ Fork, D.C. /1975/: Temperature Dependence of Chlorophyll-a Fluorescence in algae and higher plants in relation to changes of state in the photosynthetic apparatus, Dep. of Plant Biol. 1979/86. 465-472.

23./ Fork, D.C., Gijs van Ginkel and Harvey G. /1979/: A Comparative study of phase transition temperatures determined for Chloroplast thylakoid membranes and for liposomes prepared from phospholipids extracted from photosynthetic membranes of higher plants, Dep. of Plant Biol. 1979/8o.

24./ Fork, D.C., Murata, N., Avron, M. /1976/: The effect of temperature on the physical phase of chloroplast membrane lipids and photosynthesis, Dep. of Plant Biol. 1976/77. 22o-234.

25./ De Gier, J., Van Echteld, C.J.A., Van der Steen, A.T.M., Noordam, P.C., Verkley, A.J. and De Kruyff, P. /1982/: lipid Organization and Barrier Functions of Membranes, In: Biochem. and Metabolism of Plant Lipids. Ed. by J.F.G.M. Wintermans and P.J.C. Kuiper. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York- Oxford, 1982.

26./ Gitler, /1972/: Plasticity of biological membranes, A. Rev. Biophys. I. 51-92.

27./ Gounnaris, K., Mannock, D.A., Sen, A., Brain, A.P.R., Williams, W.P. and Quinn, P.J. /1983/: Polyunsaturated fatty acyl residues of galactolipids are ivolved in the control of bilayer/nonbilayer lipid transition in higher plant chloroplasts, BBA. 732. 229-242.

28./ Gyulai, G. /1984/: Lipidmetabolizmust módositó szerek hatása a fotoszintézis II. fotokémiai rendszerének aktivitására, Doktori értekezés, Bp. 1983.

29./ Gyurján, I. /1983/: A plasztom és a genom szerepe és kölcsönhatásuk a kloroplasztiszfunkciók szabályozásában, Doktori értekezés, Bp. 1983.

3o./ Harwood, J.L., Roberto, F., Murphy, D.I., Mc Keon, T.M., Stumpf, P.K. /198o/: Inhibition of fatty acid biosynthesis by metronidasole, Biochem. Soc. Trans. 8.535.

31./ Sano, H.T.Y., Matsume, A., Kasio, Y., Namura, S. and Sugawora, R. /196o/: Study of new antifungal antibiotic, Japan J. Bacteriol. 15. 1o75-1o77.

32./ Herczeg, T., Lehoczki, E., Farkas, T., Rojik, I., and Szalay, l. /1979/: Cerulenin-Induced Modification of Structural and Photosynthetic Characteristics in Chlorella, Z. Pflanzenphysiol. 94.55-64.

33./ Heyn, M.P. /1979/: Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments, FEBS LETT: 1o8.359.

34./ Knudsen, G. /1966/: Effects of Pheylethyl Alcohol on Chlorella pyrenoidosa, Phys. Plant. 19. 142-151.

35./ Laskay, G. /1981/: Lipidek szerepe a fotoszintetikus membrán szerveződésében, Doktori értekezés, Szeged, 1981.

36./ Laskay, G., Farkas, T., Lehoczki, E., Gulya, K. /1983/: Effects of Pyridazinone Herbicides during Chloroplasts Development in Detached Barley Leaves II. Effects on Lipid Content, Fatty Acid Composition and Ultrastructure of Chloroplasts, Z, Naturforsc. 38. 741-747.

37./ Leech, R.M. and D.I. Murphy. /1977/: The biosynthesis of the acyl lipids of chloroplasts. In: The intact chloroplast, Ed. by J. Barber, pp. 379-4o1, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Oxford

38./ Lehoczki, E., Herczeg, T., and Szalay, L. /1979/: The prompt effect of pyridazinone herbicides on the primary processes of photosynthesis, FEBS LETT. 1o8. 226-228.

39./ Lenaz, G. /198o/: The role of lipids in the structure and function of membranes, Subcell.Biochem. 6. 233-343.

4o./ Lentz, B.R., Barenholz, Y. and Thompson, T.E. /1976/: Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers 1. Two-Component Phosphatidylcholine Liposomes, Biochemistry, 15. 4521-4528.

41./ Lentz, B.R., Barenholz, Y. and Thompson, T.E. /1976/: Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers 2. Single Component Phisphatidilcoline Liposomes, Biochemistry, 15. 4529-4537.

42./ Leshem, Y.Y. and Inbar, M. /1977/: Resistance to Gibberellin-Induced Changes of Lipid Fluidity in Wheat Embryo Mitochondrial Membranes as Assesed by the Fluorescent Probe 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene

43./ Litvin, F.F., Stadnicsuk, I.N., Kruglov, Y.P. /1978/: Computer curve analysis of chlorofill-a absorbtion and fluorescebce in vivo. Biofizika, 23. 45o.

44./ London, E. and Feigenson, G.W. /1978/: A Convenient and Sensitive Fluorescence Assay for Phospholipid Vesicles Using Diphenylhexatriene, Analytical Biochemistry, 88. 2o3-211.

45./ Mackender, R.O. and Leech, R.M. /1974/: The galactolipid, phospholipid and fatty acid composition of the chloroplast envelope membranes of Vicia faba L. Plant Physiol. 53. 496-5o2.

46./ Mely-Goubert, B., Murray, H. Freedman, /198o/: Lipid fluidity and membrane protein monitoring using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, BBA. 6o1. 315-327.

47./ Murata, N. Ono, T., Sato, N. /1977/: Lipid phase of membrane and chilling injury in the blue-green alga, Anacystis nidulans, pp. 337-345.

48./ Murphy, D.J. /1982/: The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids, FEBS LETT. 15o. 19-26.

49./ Mühletaler, K. /1971/: The ultrastructure of plastids, In: Structure and functions of chloroplasts, Ed. by M. Gibbs, pp. 7-34. Springer, Berlin-Heidelberg-New York

5o./ Nakatani, M.Y. and Barber, J. /1977/: An Improved Method For Isolating Chloroplast retaining their Outher Membranes, BBA. 461. 51o-512.

51./ Nozawa, Y., Kasai, R. and Sekiya, T. /1979/: Modification of membrane lipids. Phenethylalcohol-induced alteration of lipid composition in Tetrahymena membranes, BBA. 552. 38-52.

52./ Ono, T. and Murata, N. /1981/: Chilling Susceptibility of the Blue-green Alga Anacystis nidulans I. Effect of growth Temperature, Plant Physiol. 67. 176-181.

53./ Ono, T., Murata, N. /1981/: Chilling Susceptibility of the Blue-green Alga Anacystis nidulans, II. Stimulation of the Passive Permeability of Cytoplasmic membrane at Chilling temperatures, 67. 176-187.

54./ Park, R.B., Biggins, J. /1964/: Qantosomes: Size and composition, Science, 144. 1oo9.

55./ Péterfi, I. /1977/: Az algák biológiája és gyakorlati jelentősége, Ceres Könyvkiadó, Bukarest, 1977.

56./ Pike, C.S. /1982/: Membrane Lipid Physical Properties in Annuals Grown under Contrasting Thermal Regimes, Plant Physiol. 7o. 1764-1766.

57./ Pringle, M.J. and Chapman, D. /1981/: Biomembrane structure and effects of temperature. In: Effects of Low Temperature on Biological Membranes pp. 21-37. Ed. by G.I. Morris and Clarce, Academic Press. London-New York-Toronto-Sydnes-San Francisco

58./ Quinn, P.J. and Williams, W.P. /1978/: Plant lipids and their role in membrane function, Prog. Biophys. Molec. Biol. 34. 1o9-173.

59./ Quinn, P.J., Gounnaris, K., Sen, A. and Williams, W.P. /1982/: Structural configuration of Plant Membrane Lipids and Their Role in the Organisation of chloroplast thylacoid constituents, In: Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids. Ed. by J.F.G.M. Wintermans and P.J.C. Kuiper. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam-New York-Oxford

6o./ Sanderman, H. /1978/: Regulation of membrane enzymes by lipids, BBA. 515. 2o9-237.

61./ Schmidt, G.W., Matlin, K.S. and NamHai Chua, /1977/: A rapid procedure forselective ensichment of photosynthetic electrontransport mutans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74. 61o-614.

62./ Shinitzky, M. and Barenholz, Y. /1974/: Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomyelin Containing Dicetylphosphate, J. Biol. Chen. 249. 2652-2657.

63./ Shinitzky, M. and Barenholz, Y. /1978/: Fluidity Parameters of Lipid Regions Determined by Fluorescence Polarization, BBA. 515. 367-394.

64./ Shinitzky, M. and Inbar, M. /1974/: Difference in Microviscosity Induced by Different Cholesterol Levels in the Surface Membrane Lipid Layer of Normal Lymphocytes and Moligнant Lymphoma cells, J. Mol. Biol. 85. 6o3-615.

65./ Siegel, C.O., Jordan, A,E. and Miller, K.R. /1981/: Addition of Lipid to the Photosynthetic Membrane: Effects on Membrane Structure and Energy Tramsfer, J. Cell. Biol. 91. 113-125.

66./ Silbert, D.F. /1975/: Genetic modification of membrane lipid, Annu. Rev. Biochem. 44. 315-339.

67./ Singer, S.I. and Nicholson, G.L. /1972/: The fluid mosaic modell of the structure of cell membranes, Science 175. 72o-721.

68./ Sklar, L.A., Hudson, B.S. and Simoni, R.D. /1975/: Conjugated Polyene Fatty Acids As Membrane probes: Preliminary Characterisation, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72. 1649-1653.

69./ Sklar, L.A., Hudson, B.S., Simoni, R.D./1977/: Conjugated Polyene Fatty Acids as Fluorescent Probes: Synthetic Phospholipid Membrane Studies, Biochemistry, 16. 819-828.

7o./ Staehelin, L.A. /1976/: Reversible particle movements associated with unstacking of chloroplast membranes in vitro. J. Cell. Biol. 71. 136.

71./ Strasser, R.J., Butler, W.L. /1977/: Fluoresvence emission spectra of photosystem-I., photosystem-II. and the light-harvesting chlorophill a/b complex of higher plants. BBA. 462. 3o7.

72./ Stubbs, C.D., Kouyoma, T., Kinosito, K. and Ikegami, A. /1981/: Effect of Double Bands on the Dynamic Properties of the Hydrocarbon Region of Lecithin Bilayers, Biochemistry, 2o. 4257-4262.

73./ Szalay, L., Lehoczki, E. /1979/: A fotoszintézis biofizikájának időszerü kérdései. A biológia aktuális problémái, 17. 9-81.

74./ Tetley, R.M., Bishop, N.I. /1979/: The differential action of/metronidazole/ on nitrogén fixation, Hidrogen Metabolism, Photosynthesis and Respiration in Anabaena and Scenedesmus BBA. 546. 43-53.

75:/ Yamamoto, Y., Ford, R.C. and Barber, J. /1981/: Relationship between Thylakoid Membrane Fluidity and the Functioning of Pea Chloroplasts, Plant Physiol. 67. 1o69-1o72.

76./ Waggoner, A.S. and Strayer, L. /197o/: Fluorescent probes of Biological membranes, Proc. Nat. Acad. Sci. 67. 579-589.

77./ White, I.R. and White, H.L. /1964/: Phenethyl alcohol synergism with nitromycin C, porphyromycin, and streptomycin, Science, 145. 1312-1313.

Köszönetem fejezem ki Dr. Szalay László egyetemi tanárnak, a JATE Biofizikai Tanszék vezetőjének egyrészt azért a lehetőségért, hogy dolgozatomat a tanszéken elkészithettem, másrészt értékes tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Lehoczki Endre tudományos főmunkatársnak, hogy szakmai tanácsokkal ellátott, a mérések megtervezésénél és kivitelezésénél értékes segitséget nyujtott.