Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

A fotoszintetikus pigment-protein komplexek szerveződésének akklimatizációs változásai Cd-stressz alatt: A transzkripciós szabályozás szerepe az antenna stresszválaszában.

Doktori (PhD) disszertáció

Készítette:

Basa Brigitta

ELTE Biológia Doktori Iskola (Prof. Dr. Erdei Anna)

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Prof. Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezetők:

Dr. Sárvári Éva
egyetemi docens

Dr. Tamás László
egyetemi docens

2012.

Rövidítések jegyzéke

BN-PAGE	Blue-native poliakrilamid gélelektroforézis
CA	kapcsoló antenna
CEF	ciklikus elektronáramlás (cyclic electron flow)
Cd10	10 napos Cd-kezelés
Cd21	21 napos Cd-kezelés
cDNS	kópia DNS
CF_o	ATP-szintáz komplex membránkötött szubkomplexe
CF_1	ATP-szintáz komplex sztrómális szubkomplexe
Chl	klorofill
Cit	citokróm
Ct	a fluoreszcencia küszöbhöz tartozó ciklusszám
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
$\Delta F/F_m'$	a PSII reakciócentumok aktuális kvantumhatékonysága fényadaptált állapotban
F	fluoreszcencia
Fd	ferredoxin
$\Phi_{f,D}$	a fluoreszcencia és a konstitutív hődisszipáció részesedése az elnyelt fényenergia allokációjában
Φ_{NF}	a nem működőképes PSII reakciócentrumok termális kioltásának aránya az elnyelt fényenergia allokációjában
Φ_{NPQ}	a fényfüggő, ΔpH-és xantofill-mediált, szabályozott hődisszipáció aránya az elnyelt fényenergia allokációjában
Φ_{PSII}	a PSII elektrontranszportjának részesedése az elnyelt fényenergia allokációjában
FNR	ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreduktáz
F_v/F_m	a PSII reakciócentrumok maximális kvantumhatékonysága
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HPLC	nagynyomású folyadék-kromatográfia (high pressure liquid cromatography)

IEF	izoelektromos fókuszálás
LHC	fénygyőjtő antennakomplex (light harvesting complex)
NDH	NAD(P)H dehidrogenáz
NPQ	nem fotokémiai kioltó folyamatok
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PC	plasztocianin
PQ	plasztokinon
PQH_2	plasztokinol
PMSF	**fenil-metil-szulfonil-fluorid**
PS	fotoszisztéma
q(RT)PCR	mennyiségi PCR analízis
RC	reakciócentrum
ROS	reaktív oxigénformák
Rubisco	ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz/oxigenáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TEMED	tetrametil-etiléndiamin
VAZ	violaxantin+anteraxantin+zeaxantin
Zx	zeaxantin

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

I. Bevezetés 6

II. Irodalmi áttekintés

1. A tilakoid membránok felépítése és működése 7

1.1. A fotoszintetikus elektrontranszport és fotofoszforiláció 7

2. A fotoszintézis pigment-protein komplexei 10

2.1. A fotoszisztéma II felépítése 12

2.2. A fotoszisztéma I felépítése 15

3. Az Lhc fehérjék szerepe a fényvédelemben 18

4. A fénygyűjtő proteinek biogenezise és az akklimatizáció mechanizmusa 21

5. Cd toxicitás a növényekben 22

5.1. A Cd hatása a fotoszintetikus aktivitásra 23

5.2. A Cd hatása a fotoszintetikus struktúrákra 24

5.3. A Cd hatása a génexpresszióra 25

6. A Cd és a Fe interakciója 26

6.1. A vashiány hatásai a fotoszintetikus apparátusra 27

III. Célkitűzés 29

IV. Anyag és módszer

1. Növénynevelés 30
2. Iontartalom meghatározás 30
3. A fotoszintetikus pigmentek analízise 31

3.1. Chl-tartalom meghatározás 31

3.2. Karotinoid-tartalom meghatározás 31

4. A fotoszintetikus aktivitás jellemzése fluoreszcencia indukcióval 32
5. A tilakoid-membránok izolálása 33
6. Klorofill-protein komplexek elválasztása Blue-native poliakrilamid gélelektroforézis (BN-PAGE) módszerrel 33
7. A fehérjék elválasztása denaturáló SDS-PAGE-sel 34
8. Pigment és fehérjekivonás a BN sávokból 35
9. 2D-PAGE: Izoelektromos fókuszálás (IEF)/SDS-PAGE 35

10. A fehérjefoltok azonosítása nanoHPLC-ESI-MS/MS módszerrel 36
11. mRNS-ek kinyerése és átírása cDNS-re 37
12. A cDNS minták fluoreszcens mérése RiboGreen festékkel 37
13. Real-Time PCR reakciók 38

V. Eredmények

1. Cd-stressz és vashiány hatása a cukorrépa fotoszintetikus apparátusára

1.1. A növények általános jellemzése 40
1.2. A pigment-protein-összetétel változásai a tilakoidokban Cd-stressz és vashiány hatására 42
1.3. A pigment-protein komplexek mennyiségének és arányának Cd-kezelés, ill. vashiány által előidézett változásai 47
1.4. BN sávok karotinoid-összetételének változása a kezelések hatására 52

2. Az akut és krónikus Cd-stressz hatása a nyárfanövények fotoszintetikus apparátusára

2.1. A növények általános jellemzése 55
2.2. A pigment-protein-összetétel változásai a tilakoidokban akut és krónikus Cd-stressz esetén 58
2.3. A pigment-protein komplexek mennyiségének és arányának változásai akut és krónikus Cd-stressz alatt 60
2.4. Az akut Cd-stressz hatása az antennák izoforma-összetételére 64

3. Az *Lhc* géncsalád transzkripciós szintjének változása nyárfalevelekben akut Cd-stressz alatt

3.1. A cDNS mennyiségi meghatározása 67
3.2. Az *Lhca* gének transzkripciós szintjének változása 73
3.3. Az *Lhca* gének expressziójának mértéke és egymáshoz viszonyított arányai 76
3.4. Az *Lhcb* gének transzkripciós szintjének változása 79
3.5. Az *Lhcb* gének expressziójának mértéke és egymáshoz viszonyított aránya 86

VI. Diszkusszió

1. Az akut Cd stressz fajonként eltérő választ vált ki 90

2. A tilakoidok összetételében és szerveződésében bekövetkező változások Cd-stressz, ill. vashiány hatására 92

2.1. A pigment-protein komplexek szerveződésének Cd-stressz hatására bekövetkező változásaiért elsősorban a Cd-indukált vashiány felelős 93

2.2. A pigment-proteinek átszerveződésére akut Cd-stressz alatt előfeltétele a későbbi regenerációnak 96
2.3. Az akut Cd-stressz változásokat idéz elő az Lhca és Lhcb izoformák Megjelenésében 99
3. Az *Lhc* géncsalád transzkripciójának szabályozása nyárfában 99
3.1. A levél fejlődési állapota befolyásolja az *Lhc* gének transzkripcióját 101
3.2. Az *Lhc* gének nagy része közös transzkripciós szabályozás alatt áll 101
3.3. Egyes Lhc fehérjéknek kiemelkedő szerepe van a stresszválaszban 104
VII. Összefoglalás 107
VIII. Summary 108
Irodalomjegyzék 109
Köszönetnyilvánítás 129

I. Bevezetés

A nehézfémek és az általuk okozott károk az emberi tevékenység által váltak környezetvédelmi problémává. Természetes előfordulásuk csekély, vulkanikus, esetenként üledékes kőzetek ritka komponensei. Természetes környezetben a Cd kísérő fémként fordul elő az Pb és Zn mellett (*Baker és mtsai, 1990*). Talajokba leginkább különböző ipari és mezőgazdasági tevékenységek révén jut. Az élőlények szempontjából a Cd nem-esszenciális átmeneti nehézfém, így a növények számára is mérgező. Számos metabolikus folyamatot, köztük a produkció szempontjából nagy jelentőségű fotoszintézist is gátolja. Bár a Cd-stressz irodalma gazdag, a leírt tünetek hátterében álló pontos hatásmechanizmus még korántsem ismert. Tudjuk, hogy az SH-csoportokhoz való kötődése, fémionok helyettesítése révén zavarokat okozhat az enzimfehérjék aktivitásában, ami a szén-dioxid-fixáció és a fotoszisztéma II aktivitásának csökkenésében mutatkozik meg. A szabad ionként előforduló Cd^{2+} a növényi szervezetben kompetícióban áll több esszenciális fémionnal is. A vas közülük kiemelkedően fontos a fotoszintézis szempontjából. A Cd gátolja a Fe felvételét és transzlokációját is, ezért a Cd-stressz egyik jellegzetes tünete a vashiány okozta klorózis, ami a vasat igénylő klorofill-szintézis zavarainak köszönhető. A Cd azonban közvetlen módon is képes zavarokat okozni a növényi fotoszintézisben. Arra voltunk tehát kíváncsiak, hogy a fotoszintetikus apparátus kialakulását erősen befolyásoló Fe-hiány milyen mértékben járul hozzá a Cd-stressz pigment-protein komplexeket érintő tüneteihez.

A fotoszintetikus apparátus képes bizonyos mértékben alkalmazkodni a stresszorok jelenlétéhez. Az ún. akklimatizáció során megváltozik a fotoszintetikus működés, ami együtt jár a komplexek szerveződésének, ill. az antenna szerkezetének átalakulásával. E folyamatok hátterében transzkripciós, transzlációs és poszttranszlációs szintű szabályozás egyaránt állhat. Az antenna-komponensek esetében a legvalószínűbbnek tartott mechanizmus a transzkripciós szabályozás, aminek a Cd-stresszválaszban betöltött jelentőségét kívántuk felderíteni. Ennek érdekében a pigmenttartalmú tilakoid-komplexek összetételében és szerveződésében bekövetkező változásokat összevetettük az akklimatizációban elsődleges szerepet betöltő antenna fehérjék transzkripciójának változásával Cd-stressz alatt.

II. Irodalmi áttekintés

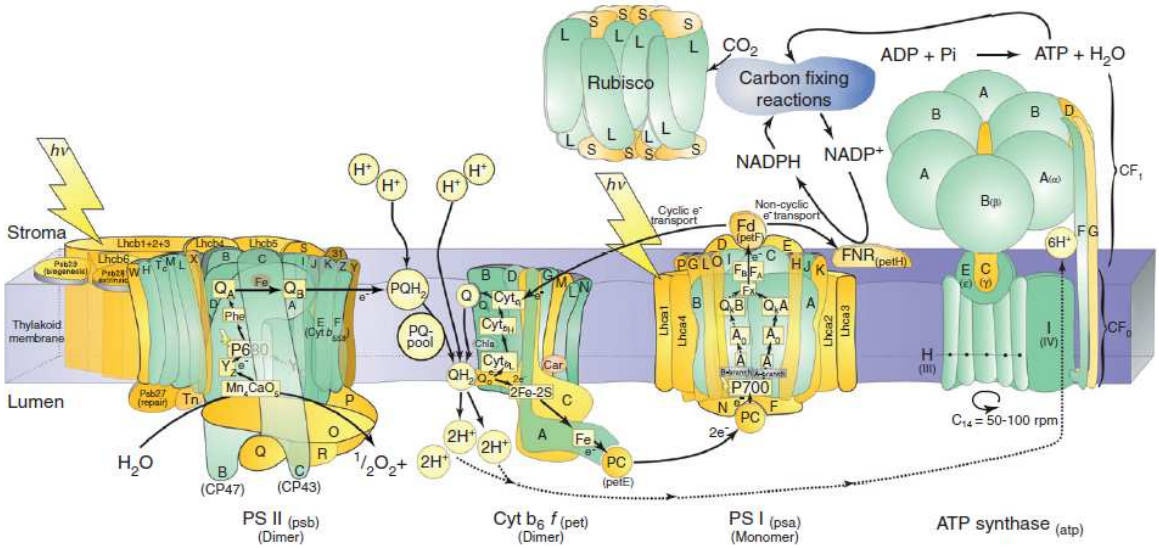
1. A tilakoid membránok felépítése és működése

A magasabbrendű növények fotoszintetikus apparátusának fő alkotóelemei a kloroplasztisz tilakoid-membránjaiba ágyazott nagy multiprotein-komplexek (1. ábra). Ezek közreműködésével megy végbe a fényenergia abszorpciója és kémiai energiává való átalakítása, amelynek kísérő folyamata a vízmolekula bontása és O_2-evolúció. E reakciók lebonyolításában részt vesz a két fotoszisztéma (PSI és PSII), a citokróm (Cit) b_6f komplex, valamint az ATP szintáz. A fotoszintézis „termékei" a NADPH és ATP molekulák, amelyek a sejt felépítő biokémiai folyamataihoz szolgáltatnak redukáló erőt és energiát.

A fotoszintézis fényreakcióit katalizáló multiprotein-komplexek a lapított, zsákszerű membránokból felépített tilakoidokban helyezkednek el. A tilakoidok folytonos, háromdimenziós hálózatot alkotnak a kloroplasztiszok belsejében. Az általuk közrezárt tér a lumen. A tilakoid membránrendszer két fizikailag elkülöníthető doménje az egymásra rétegződött korongokból álló gránum tilakoidok, és az összekötő membránelemeket tartalmazó sztróma lamellák. A PSI és az ATP szintáz a sztrómalamellákban, míg a PSII csaknem kizárólag a gránumokban fordul elő, a Cit b_6f komplex pedig főleg a gránumokban, azoknak is a széli részein helyezkedik el (*Dekker és Boekema, 2005*).

1.1. A fotoszintetikus elektrontranszport és fotofoszforiláció

A fotoszintetikus membránprotein-komplexek funkció szerint a következőképpen állíthatóak sorba: 1) PSII a víz-plasztokinon oxidoreduktáz, 2) Cit b_6f-komplex a plasztokinon-plasztocianin oxidoreduktáz, 3) PSI a plasztocianin-ferredoxin oxidoreduktáz, 4) az ATP-áz pedig a protongradiens által hajtott ATP szintáz (*Nelson és Ben-Shem, 2004*). Az elektronok továbbításában szerepet játszik a membránban oldott mobilis plasztokinon (PQ), a lumenben található plasztocianin (PC), valamint a sztrómában oldott ferredoxin (Fd), amelyek az elektron transzport során időlegesen a megfelelő komplexekhez kapcsolódnak.



1. ábra: A multiprotein membrán-komplexek és a szolubilis komponensek elrendeződése a tilakoidokban az eletrontranszportláncban részt vevő kofaktorok feltüntetésével. Sárga szín jelöli a magban, zöld szín a plasztisz genomban kódolt proteineket (*Allen, 2011*).

A tilakoid-membránban található pigment molekulák nagy részét a fénygyűjtő antenna komplexek (LHC) kötik, amelyek lényegesen megnövelik a PS-k által elnyelhető fényenergia mennyiségét. Az energia az antennákról a PSI és a PSII reakció centrumát alkotó klorofill (Chl) *a* dimerekre (P700 és P680) kerül. A foton abszorpció és a gerjesztési energia átadása az LHC és a reakciócentrum (RC) Chl-molekulái között 10^{-15}-10^{-12} s alatt játszódik le. A PSII reakció centrumokban akkor mehet végbe töltés-szeparáció, amikor a primer akceptor redukált, vagyis nyitott állapotban vannak. Ekkor a P_{680} oxidálódik és az elektron egy feofitin molekulán keresztül átadódik az első stabil elektron akceptorra, a Q_A plasztokinon molekulára. Ez a stabil töltés-szeparációt előidéző folyamat 10^{-9}-10^{-6} s alatt megy végbe, melynek eredményeként a PSII reakciócentrum zárt állapotba kerül, és gerjesztési energiát nem képes fogadni. A következő fotokémiai ciklus végbemeneteléhez szükség van P_{680}^+ redukciójára. Az elektron vízmolekulákból származik, amelyek bontását a Mn-tartalmú vízbontó komplex végzi. A vízmolekulákról a D1 reakciócentrum-fehérje Y_Z-tirozinján keresztül egy elektron adódik át P_{680}^+-ra, míg a feofitinről Q_A-ra átadott elektront a másodlagos elektron akceptor Q_B-molekula (kötött PQ) veszi át. Ennek eredményeként a reakciócentrum újra nyitott állapotba kerül. Két fotokémiai ciklus szükséges ahhoz, hogy a PSII akceptor oldalán kötött PQ két elektronnal redukálódjon, és két protont felvéve a sztrómából, plasztokinollá (PQH_2) alakuljon. A donor oldalon a vízbontó komplex által koordinált két vízmolekula oxidációjához négy fotokémiai ciklus szükséges, miközben molekuláris oxigén szabadul fel (*Wilson, 2006*).

A PQH_2 a PSII-ről leválva a tilakoidmembránba diffundál, ahol a Cit b_6f komplex segítségével oxidálódik vissza. A PQH_2 egyik elektronja a Rieske-féle vas-kén centrumon és a Cit *f*-en keresztül a mobilis PC-ra kerül, mely továbbítja azt a PSI akceptor oldalához. A PQH_2-ról származó másik elektron a Cit b_6-protein két *b* típusú és egy atípusos hem-csoportja a membrán sztróma felőli oldalán egy PQ-molekulára továbbítja, amely PQH_2-á redukálódik. Ez ugyanúgy képes visszaoxidálódni a Cit b_6f komplex plasztokinol kötő helyén, mint a PSII által redukált Q_B (Q-ciklus). Egy PQH_2 Cit b_6f komplexen történő oxidációja során 2 proton adódik le a lumenbe. A PQH_2 oxidációjához 10^{-3} s szükséges, emiatt ez a reakció az elektron-transzportlánc sebesség-meghatározó lépése.

A PSI reakciócentrumában lévő P_{700} az abszorbeált fényenergia hatására szintén foto-oxidálódik és P_{700}^+-zá alakul. A PSI kvantumhatékonysága igen nagy, majdnem mindegyik abszorbeált foton töltésszeparációt idéz elő a központi P_{700} és a primer akceptor Chl *a* között. A gerjesztett P_{700} elektronjait az elektrontranszportlánc további komponensei az A_0 (Chl *a*), A_1 (fillokinon) akceptorok, valamint az F_x, F_A és F_B vas-kén centrumok továbbítják a Fd-ra. Két egymást követő fotokémiai reakció szükséges a $NADP^+$ redukciójához NADPH-vá, amelyet a Fd-$NADP^+$-oxidoreduktáz enzim katalizál.

A PSII lumen felöli oldalán végbemenő vízbontás és a PQH_2 Cit-b_6f komplexen történő oxidációja egyaránt protonokat juttat a tilakoidok lumenébe. Az ATP szintéziséhez szükséges nagyenergiájú állapotot az így létrejövő protongradiens biztosítja. A lumenben felhalmozódott protonok a fotoszintetikus foszforiláció során az ATP-áz protoncsatornáján (CF_o - c alegységek) keresztül visszakerülnek a sztrómába, miközben konformáció változást idéznek elő a CF_1-en, így a megkötött ADP-ből és P_i-ből ATP képződik.

A fenti lineáris elektrontranszporton kívül létezik a fény hasznosításának egy ciklikus elektronáramláson (CEF) alapuló, pusztán ATP-t szintetizáló módja is. A CEF működése során a redukált Fd a Cit b_6f komplexnek adja át elektronját, amely innen ismét visszajut a PSI-re. Az eközben lejátszódó Q-ciklus megteremti az ATP szintézis feltételeit. A Fd-ról a PQ-ra történő e^--átadás kétféle úton lehetséges, a NAD(P)H dehidrogenáz(NDH)-függő és a Fd-függő út, amely utóbbit PGR5 (Proton Gradient Regulator 5)-függő útnak is nevezik, az egyik kulcsfontosságú fehérje után (*Munekage és mtsai, 2002*). A lineáris és a ciklikus elektrontranszport verseng egymással az oxidált Fd-ért, az egymáshoz képesti arányukat a kloroplasztisz oxidációs állapota és főként a PSI donor és akceptor oldala közötti oxidációs egyensúly szabályozza (*Joliot és Joliot, 2002; Kramer és mtsai, 2004*). A CEF jelentőségét a C3-as növényekben sokáig megkérdőjelezték, de az újabb kutatások bizonyították fontosságát (*Munekage és mtsai,*

2004; DalCorso és mtsai, 2008). A CEF fontos szerepet játszik az anyagcsere-folyamatok szükségleteinek megfelelő ATP/NADPH arány kialakításában (*Livingston és mtsai, 2010*), illetve a fotoszintézis indukciójakor, valamint stressz körülmények között is (*Joliot és Joliot, 2002, 2006; Golding és Johnson, 2003; Golding et al., 2004*). A PGR5 függő e^--transzportot tekintik a fő ciklikus útnak, amely a lumen savanyodásáért és ennek hatására a PSII-ben a nem-fotokémiai kioltó folyamatok (NPQ) aktivációjáért felelős (*Shikanai, 2007a*). Az NDH-függő út funkciójaként írták le, hogy a sztróma túlzott redukcióját akadályozza meg, ami különösen stressz körülmények között létfontosságú (*Munekage és mtsai, 2004; Shikanai, 2007b*).

2. A fotoszintézis pigment-protein komplexei

A fényenergia összegyűjtését és kémiai energiává történő átalakítását a tilakoidok pigment-tartalmú komplexei, a PSI és a PSII bonyolítják le (1. táblázat). A PSI és PSII reakciócentrumai és a belső antenna komplexei Chl *a*-t és *β*-karotint kötő, a plasztiszban kódolt és szintetizált fehérjék (*Green és Durnford, 1996*). Az ezek köré rendeződött perifériális fénygyűjtő Chl-protein komplexek, az LHCI és LHCII, Chl *a/b*-proteinek, kis mennyiségben xantofillokat is kötnek. Transzkripciójuk a sejtmagban kódolt génekről történik és a citoplazmában szintetizálódnak (*Jansson, 1994; Green és Durnford, 1996*).

A fotoszintetikus pigment-protein komplexek nemcsak az elektrontranszport működéséhez szükséges fényabszorpciót, hanem fényfelesleg esetén az energia disszipációját is biztosítják. Ez általában a pigmentkötő komponensek az alacsony tilakoid-lumen pH által indukált konformáció változásaival és az ún. xantofill-ciklus során történő violaxantin-zeaxantin átalakulásokkal hozható összefüggésbe (ld. később).

1. táblázat A magasabbrendű növényekben jelenlévő Chl-proteinek jellemzése.

				Pigmentek						Fluor. em 77K (nm)	Hivatkozások
Proteinek	Tömeg (kDa)	TMH	gén	Chl	Chl *a/b*	*β*-karotin	lutein	neoxantin	violaxantin		
PSII *core*											Zouni és mtsai, 2001
D1	38	5	*PsbA*^{C}	3	-	1	-	-	-		
D2	39	5	*PsbD*^{C}	3	-	1	-	-	-		
CP47	56	6	*PsbB*^{C}	16*	-	3	-	-	-	695	
CP43	50	6	*PsbC*^{C}	13*	-	5	-	-	-	683	
PSII CA											
CP29	29	3	*Lhcb4*^{N}	8	3.0	-	1.0	0.35	0.65	680	Crimi és mtsai, 2001
CP26	26	3	*Lhcb5*^{N}	8	2.2	-	1.0	0.61	0.38	680	Croce és mtsai, 2002a
CP24	24	3	*Lhcb6*^{N}	10	1.0	-	1.0	-	1.00	680	Bassi és mtsai, 1993
Lhcb7	+	3v.4	*Lhcb7*^{N}	+	+		+	+	+	+	Klimmek és mtsai, 2006
Lhcb8	+	3	*Lhcb8*^{N}	+	+		+	+	+	+	Klimmek és mtsai, 2006
LHCII											
Lhcb1	25	3	*Lhcb1*^{N}	14	1.3	-	1.9	1.0	0.2	680	Liu és mtsai, 2004
Lhcb2	25	3	*Lhcb2*^{N}								
Lhcb3	24	3	*Lhcb3*^{N}								
PsbS	22	4	*PsbS*^{N}	5	6.0		0.6	0.3	0.25	675	Funk és mtsai, 1995
PSI *core*				96*	-	22*	-	-	-	720	Jensen és mtsai, 2007
PSI-A	83	11	*PsaA*^{C}	43*	-		-	-	-		
PSI-B	82	11	*PsaA*^{C}	42*	-		-	-	-		
LHCI											Croce és mtsai, 2002b
Lhca1	22	3	*Lhca1*^{N}	10	4.0	-	2.0	-	1	686	
Lhca2	23	3	*Lhca2*^{N}	10	1.9	-	1.5	-	0.5	701	
Lhca3	25	3	*Lhca3*^{N}	10	6.0	0.6	1.4	-	0.7	725	
Lhca4	22	3	*Lhca4*^{N}	10	2.3	-	1.5	-	0.5	732	
Lhca5	24	3	*Lhca5*^{N}	12	2.6	+	+	+	+	684	Storf és mtsai, 2005
Lhca6	+	3	*Lhca6*^{N}	+	+		+	+	+	+	Klimmek és mtsai, 2006

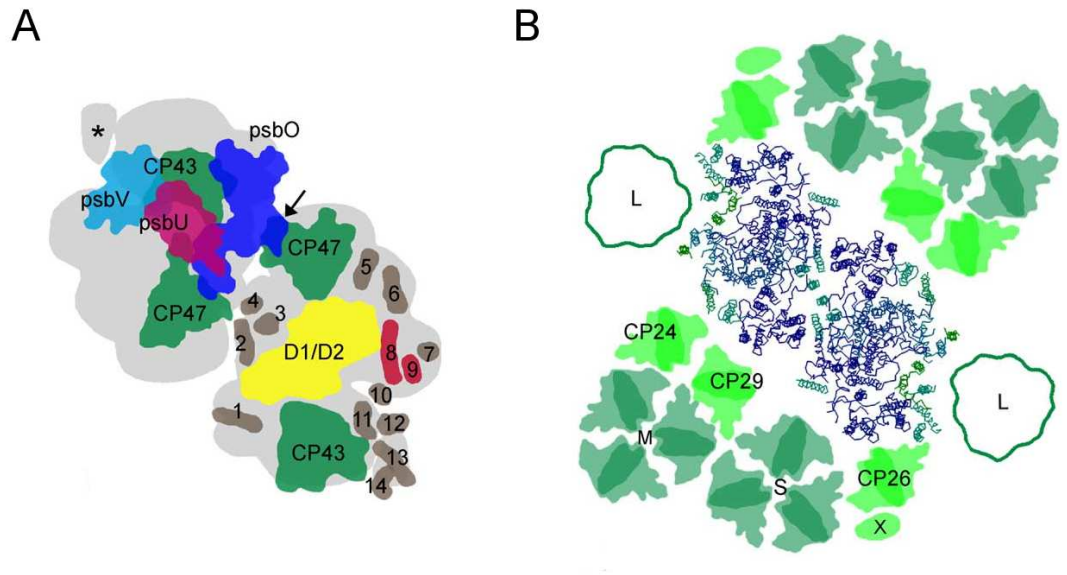
N: magban kódolt, C: kloroplasztiszban kódolt, TMH: transzmembrán hélix, CA: kapcsoló antenna, PsbS: a nem-fotokémiai kioltásban szereplő, Lhc-családba tartozó fehérje, +: pontos adat nem ismert; –: bizonyítottan nincs jelen.* Cianobaktériumok komplexeiből származó adatok.

2.1. A fotoszisztéma II felépítése

A PSII struktúrájára vonatkozó adatok a különböző baktériumokból kristályosított PSII partikulumok elemzéséből származnak (*Loll és mtsai, 2005; Guskov és mtsai, 2009*), a magasabbrendű növények PSII komplexének nagyfelbontású analízise még várat magára. Az olyan érzékeny technikák, mint a folyadék kromatográfia és SDS-PAGE tömegspektrometriával kombinálva a PSII újabb alkotóelemeinek felfedezéséhez vezetett.

A PSII központi heterodimerjén, a D1/D2 proteineken kötődnek az elektrontranszportlánc komponensei: a P680, a vízbontó rendszer Mn-centruma, egy Chl *a*, egy feofitin *a*, valamint Q_A és Q_B kinon molekulák (*Zouni és mtsai, 2001; Dekker és Boekema, 2005;* 1. táblázat). Egy-egy további Chl *a* és feofitin *a* struktúrastabilizáló szerepet tölt be, és további 2 perifériásan kötődő Chl *a* az antennákról való energiatranszfer irányításában játszik szerepet. A dimeren 2 *β*-karotin is található. A heterodimerhez kapcsolódnak a belső antennaként funkcionáló CP43 és CP47 Chl *a-t és β*-karotint kötő pigment-proteinek. Mindkét protein 6 transzmembrán hélixet tartalmaz, a CP43 50 kDa, a CP47 56 kDa molekulatömegű. A CP43 13 Chl *a* molekula mellett 5 β–karotint, a CP47 16 Chl *a* mellett 3 *β*–karotint köt. A komplex központi (*core*) része ezen kívül nagyszámú, kis molekulatömegű, pigmentet nem kötő fehérjét tartalmaz. Többségük szerepe mindezidáig nem tisztázott. A lumen felőli oldalhoz kapcsolódnak a vízbontó apparátust hordozó PsbO-Q fehérjék (cianobaktériumokkan PsbO, PsbU és PsbV, ld. 2.A ábra). A legkisebb méretű komponensek nem érik el az 5 kDa tömeget, vagyis nagyjából 40-60 aminosavat tartalmaznak, amelyek mindössze egy transzmembrán α-hélixet alkotnak. Cianobaktériumok PSII komplexében 14 ilyen transzmembrán hélixet találtak (2.A ábra). Közülük a PsbE és PsbF a Cit b_{559} két alegysége, melyek esszenciálisak a PSII struktúra és a funkció szempontjából (*Swiatek és mtsai, 2003*). A funkcionálisan aktív PSII a magasabbrendű növényekben egy 1100 kDa méretű szuperkomplexet képez az LHCII-vel, amelyben a PSII dimer formájában van jelen. A dimer-struktúra stabilizálásában fontos szerepe van a kisméretű fehérjéknek, mint például a két monomer találkozási felületén elhelyezkedő PsbL, PsbM és PsbTc elemeknek, valamint a PsbI és PsbW komponenseknek (*Shi és mtsai, 2012*). A PsbR alegység génjét csak zöldalgákból és magasabbrendű növények genomjából mutatták ki, a kristályosított cianobaktérium PSII-ben a fehérje nincs jelen. Valószínűsítik azonban, hogy a vízbontó apparátust hordozó PsbO-Q fehérjék dokkolásában lehet szerepe (*Suorsa és mtsai, 2006*). Több kisméretű fehérje jelenléte elengedhetetlen a PSII megfelelő működéséhez, mint ahogy bebizonyosodott, hogy a PsbJ,

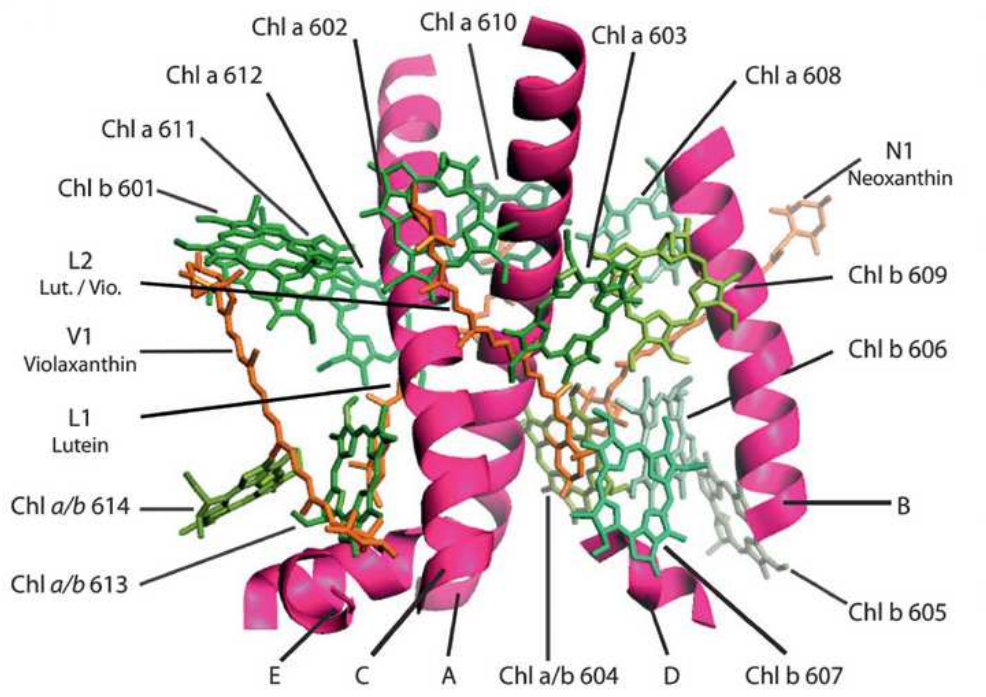
PsbTc és PsbX fontosak a kinonok közötti e^--transzpontban és a kinon-turnoverben. Az újabb kutatások négy, eddig ismeretlen fehérjét fedeztek fel, amelyek közül a Psb27 és Psb32 (szolubilis komponensek) a lumen felöli oldalon, míg a Psb28 és Psb29 a tilakoidmembrán sztróma felöli felületén kapcsolódnak időlegesen (*Shi és mtsai, 2012*).



2. Ábra A: cianobakteriális PSII *core* komplex transzmembrán fehérjéi (jobb oldal) és a lumen oldali felszínhez kapcsolódó külső fehérjék (bal oldal). A fekete nyíl a két monomer találkozási felszínét jelöli. 1-12 rendre: PsbI, PsbTc, PsbL, PsbM, PsbH, PsbX, PsbY, PsbF, PsbE, PsbJ, PsbK, Psb30; 13-14: PsbZ. **B:** a PSII-LHCII szuperkomplex felülnézete a spenótból készült elektromikroszkópos kép alapján. S, M és L rendre: erősen, közepes erősséggel és gyengén kötődő LHCII trimerek. X: PsbW (*Dekker és Boekema, 2005; Shi és mtsai, 2012*).

A PSII-ben előforduló Chl-ok nagy részét a perifériás antennakomplex köti, melyet Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 fehérjéket eltérő arányban tartalmazó LHCII trimerek alkotnak (*Jansson, 1994; Green és Durnford, 1996*). A perifériás LHCII trimerek *core* komplexhez való kötődését és az energiatranszfert a *core* komplex felé kapcsoló antennákat (CA) alkotó monomer Chl *a/b*-proteinek, az Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26), Lhcb6 (CP24) fehérjék biztosítják. A trimerizációhoz szükséges aminosav szekvenciát (WYGPDR) az Lhcb1-3 fehérjék N-terminális szakasza tartalmazza. Meglepő módon az Lhcb5, ami általában monomerként van jelen, szintén hordozza ezt a motívumot. Leírták azt is, hogy az Lhcb1 és 2 hiánya esetén képes homotrimereket, valamint az Lhcb3-al heterotrimert alkotni, és az LHCII antenna szerepét betölteni (*Ruban és mtsai, 2006*). Mára ismertté vált az LHCII komplex Röntgen-krisztallográfiás 2.7 Å felbontású szerkezete (*Liu és mtsai, 2004*), valamint a CP29 monomer antenna szintén hasonló felbontású struktúrája (*Pan és*

mtsai, 2011). A proteinek három transzmembrán hélixet (A-C) és két, a lumen felöli oldalon elhelyezkedő amfipatikus spirált (D, E) tartalmaznak (3. ábra).



3. ábra Az LHCII monomer szerkezeti modellje. a Chl- és xantofill-molekulák helyzetének feltüntetésével (*Ballottari és mtsai, 2012*).

Az LHCII monomer komponensei 4 xantofillt és 14 Chl-molekulát kötnek, az LHCII szerkezet stabilitásához hozzájárul két lipid-molekula is, a foszfatidil-glicerol és a digalaktozil-diacil-glicerol. A fehérjéken négy karotinoid kötőhely található, az L1 és L2 luteint, az N1 neoxantint és a V1 xantofill-ciklusban szereplő pigmentet köt (3. ábra), melyeknek fontos szerepe van egyrészt a struktúra fenntartásában (L1 lutein), másrészt a fénygyűjtésben (neoxantin), valamint a fényvédelemben (L2, violaxantin). A CP29 (Lhcb4) szerkezetében 3 xantofill és 12 Chl található. Bár az CP26 (Lhcb5) antennában 3 xantofillt és mindössze 10 Chl-t sikerült eddig biztosan azonosítani, feltételezik, hogy pigmentösszetétele hasonló a CP29-éhez. A CP24 (Lhcb6) antennában szintén 10 Chl-molekulát, viszont csak két xantofillt mutattak ki. Az L1 és L2 helyekhez a komplexben rendre lutein és violaxantin kapcsolódik, míg a neoxantin jelenlétét nem sikerült kimutatni (*Passarini és mtsai, 2009*). A CP29 és CP24 antennában egyaránt bebizonyították, hogy a violaxantin kötéséért az L2 hely a felelős, mely a fénygyűjtő és az energia disszipáló

állapotok közötti átmenetet szabályozza (*Dall'Osto és mtsai, 2005, Passarini és mtsai, 2009*). Bár a pontos molekuláris mechanizmus még nem ismert, feltételezik, hogy az L2 helyre kötő zeaxantinnak köszönhetően jön létre az átmenet.

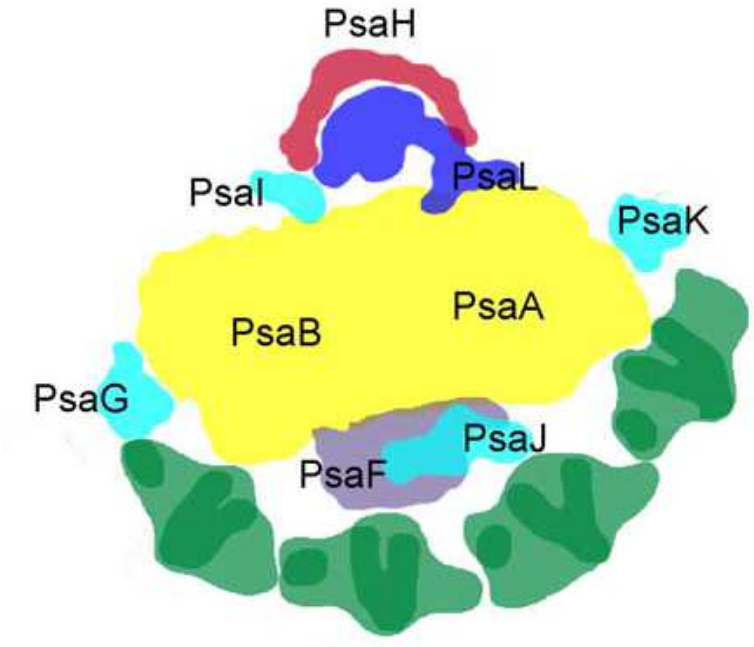
A magasabbrendű növényekben két korábban ismeretlen Lhcb fehérje jelenlétére is találtak bizonyítékokat, a fehérjék szerkezetére egyelőre csak a nukleinsav szekvencia által tudunk következtetni. Az *Lhcb8* gén jelenlétét először Arabidopsis-ban mutatták ki, és a szekvenciája alapján *Lhcb4.3*-nak nevezték el, vagyis az Lhcb4 egyik izoformáját vélték felfedezni benne (*Jansson és mtsai, 1999*). A későbbi *in silico* analízis azonban arra engedett következtetni, hogy egy külön szabályozás alatt álló *Lhcb* génről van szó, amit aztán *Lhcb8*-nak neveztek el (*Klimmek és mtsai, 2006*). Az EST és genomi adatok analízise még egy további taggal bővítette az *Lhc* géncsaládot. Bár az Lhcb7 jelenlétét a PSII-ben még nem bizonyították, szekvenciája alapján az Lhcb5-höz áll legközelebb (*Klimmek és mtsai, 2006*). Tartalmazza a jellegzetes Lhc-motívumokat, mint a 3 transzmembrán hélixet, a Chl- és karotinoidkötő helyeket. Viszont találtak egy 4. transzmembrán hélixre utaló részt is, ami alapján az érett fehérjét jóval hosszabbnak valószínűsítik, mint bármelyik másik ismert Lhc fehérjét. A gén homológjai az egyszikű és kétszikű növényekben egyaránt megtalálhatók, sőt a kódoló régiója már a nyitvatermőkben is jelen van. Az egyes Lhcb fehérjéknek fajtól függő számú, valószínűleg különböző funkciójú izoformája mutatható ki (*Jansson, 1999; Zolla és mtsai, 2003; Klimmek és mtsai, 2006*).

2.2. A fotoszisztéma I felépítése

A PSI funkció szerint 2 részre, a központi (*core*) és az antenna komplexre, bontható. A *core* hordozza a töltésszeparációban és az azt követő elektronátadási folyamatokban részt vevő komponenseket, valamint a belső fénygyűjtő antennát (*Amunts és mtsai, 2007*). A *core* antennát egészíti ki a külső LHCI antenna komplex, amely sarló alakú struktúrát alkotva a *core*-komplex PsaF/PsaJ oldalához kapcsolódik az ún. *gap* (réskitöltő) Chl-molekulákon keresztül (*Ben-Shem és mtsai, 2003*). Jelen ismereteink szerint 15 alegység (PsaA-L és PsaN-P) alkotja a *core* részt, a kikristályosított PSI-LHCI komplexben 173 Chl-t, 15 *β*-karotint, 3 vas-kén (4Fe-S) centrumot és 2 fillokinont és 4 lipidet (1-foszfatidil-glicerol, 3-digalaktozil-diacil-glicerol) azonosítottak.

A PsaA és PsaB által alkotott központi heterodimeren található a P_{700} Chl *a*-*a*' reakciócentrum és az elektrontranszportlánc elemei, az A_0 monomer Chl *a*, az A_1 fillokinon, valamint az F_x (Fe_4-S_4) vas-kén centrum (*Jordan és mtsai, 2001; Dekker és*

Boekema, 2005; 2. ábra). A heterodimerhez kötődik még körülbelül 80 Chl *a* molekula, amelyek a belső antennát alkotják. A két további vas-kén centrum (F_A és F_B) a PsaC polipeptiden kötődik. Egyéb komponensei közül a sztróma felöli oldalon a PsaD, PsaE a Fd, a lumen felöli oldalon a PsaF és PsaN a mobilis PC kötésében vesz részt (*Farah és mtsai, 1995; Haldrup és mtsai, 1999*). A PsaJ komponens a PsaF orientációjában játszik szerepet (*Fischer és mtsai, 1999, Hansson és mtsai, 2007*). Kimutatták, hogy a PsaG alegységnek fontos szerep jut az Lhca1/Lhca4 dimer kötésében, míg az Lhca3/Lhca2 a PsaK közvetítésével kötődik a *core*-hoz (*Ben-Shem és mtsai, 2003, Haldrup és mtsai, 2000*). A PsaH, PsaL, PsaO, PsaP és PsaI alegységek az LHCII proteinek dokkoló helyét alkotják, ami a PSII fényfeleslege esetén kötődhet a PSI-hez (*Jensen és mtsai, 2007*).



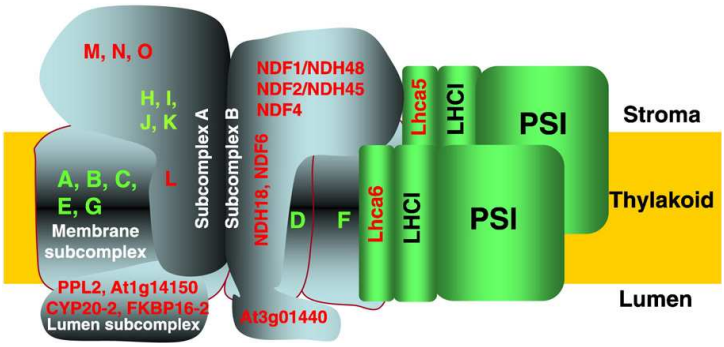
4. ábra: A PSI sematikus felépítése (*Dekker és Boekema, 2005*)

A PSI fénygyűjtő komplexe az LHCI, melyet az Lhca1-4 pigment-proteinek építenek fel (*Jansson, 1994; Green és Durnford, 1996*). Az egyes Lhca fehérjéknek is kimutathatók izoformái (*Storf és mtsai, 2004*). Három transzmembrán hélixet tartalmaznak, amelyeken összesen 10 Chl-molekulát kötnek (1. táblázat). Emellett karotinoidok is assziciálódnak hozzájuk különböző mennyiségben. Az LHCI-t alkotó Lhca fehérjék két dimert alkotva félhold alakban kapcsolódnak a komplex PsaF felöli oldalához (*Ben-Shem és mtsai, 2003*). Az Lhca1-Lhca4 és az Lhca2-Lhca3 dimerek proteinjei a túlnyúló N- és C-terminális doménjeiken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A monomerek között

hídként funkcionáló „linker” Chl-ok találhatóak, melyeknek szerepük lehet az LHCI-lánc mentén történő energiamigrációban. Csak az Lhca1 monomer kötődik szorosan a reakciócentrumhoz a PsaG-vel való hélix-hélix asszociáció révén. A többi Lhca monomer kapcsolódása relatíve gyenge, legtöbbször a sztrómális doméneken és egymáson keresztül valósul meg. Az LHCI-t az Lhca1-Lhca4 dimer horgonyozza a PSI-hez, lehetővé téve azonban a struktúra dinamikus átalakulását a fényintenzitás és a tápanyag ellátottság függvényében (*Jansson és mtsai, 1997; Dekker és Boekema, 2005*).

Először az Arabidopsis genomban azonosítottak két gént, amelyek a már ismert Lhca1-4 polipeptideken kívül további két Lhca-t, az Lhca5 és Lhca6 fehérjéket kódolják (*Ganeteg és mtsai, 2004*). A genomi adatbázisok bővülésével azonban számos más növényben is megtalálták homológjaikat, és az Lhca5-öt fehérje szinten is kimutatták (*Storf és mtsai, 2004; Zolla és mtsai, 2007*). További vizsgálatokkal megállapították, hogy a protein 12 Chl-molekulát köt. A Chl *a/b* aránya 2,6 és általában 3 karotinoid is megtalálható rajta (*Storf és mtsai, 2005*). Normál körülmények között valószínűleg nagyon kis számban reprezentált és kapcsolódása gyenge kölcsönhatásokon alapul (*Lucinski és mtsai, 2006*). Kimutatták, hogy az Lhca5 részt vesz a fénygyűjtésben, és heterodimert képezve az Lhca1-gyel bizonyos körülmények között helyettesítheti az Lhca4-t (*Storf és mtsai, 2005*).

Újabb kutatásokból az is kiderült, hogy a plasztiszban jelenlévő NDH a PSI-el egy nagy molekulatömegű szuperkomplexet alkot (5. ábra) és a komplexek kölcsönhatásában az un. minor Lhc-k, az Lhca5 és Lhca6 fehérjék elengedhetetlenül szükségesek (*Peng és mtsai,2008, 2009*). Míg az Lhca5 fehérje a monomer PSI-hez is kötődik, nem mondható el ez az Lhca6-ról, melynek jelenlétét reverz fázisú HPLC-vel, több különböző növényből, izolált PSI fehérje-összetételének analízisével sem sikerült kimutatni (*Zolla és mtsai, 2007*). Úgy tűnik, hogy az Lhca6 csak a NDH-PSI szuperkomplexben van jelen. Szerepe, az Lhca5-el együtt, a két komplex kölcsönhatásának stabilizálása lehet. A *Peng és mtsai (2011)* által közölt sematikus modell szerint a szuperkomplexben legalább két PSI-et kópiát találunk, amelyek az LHCI-en és az un. minor Lhca-kon keresztül kapcsolódnak az NDH-hoz, így képezve a több mint 1000 kDa-os működőképes egységet.



5. Ábra: Az NDH-PSI komplex sematikus felépítése (*Peng és mtsai, 2011*). A plasztiszban kódolt alegységeket zöld, a magban kódoltakat piros betű jelöli.

3. Az Lhc fehérjék szerepe a fényvédelemben

Az evolúció során az Lhc fehérjék megjelenése a szárazföldi fotoszintézis fontos feltétele volt. Az eltérő izoformák specifikus fénygyűjtő és fényvédő funkcióval rendelkeznek, így a szupramolekuláris fotoszintetikus apparátus képes alkalmazkodni a folytonosan változó környezeti feltételekhez. A fénygyűjtő Chl-protein komplexek nélkül a fotoszintézis hatékonysága nagyon alacsony lenne. Ezek biztosítják a megfelelő mennyiségű foton abszorpcióját a RC-ok maximális gyorsasággal történő működéséhez. A fény, mint szubsztrát mennyisége és spektrális tulajdonságai is folytonosan változnak, ezért a fénygyűjtés szabályozására a növényekben többféle mechanizmus alakult ki. Közepes fényintenzitásnál a PQ-pool redoxállapota szabályozza a fényenergia egyenletes megoszlását a két fotokémiai rendszer között, ami egy rövidtávú alkalmazkodást tesz lehetővé. A PQ-pool redukált állapota aktivál egy a tilakoidokban jelenlévő, membránkötött kinázt, amely az LHCII egy részét foszforilálja (*Allen és Forsberg, 2001*). Ennek következtében az LHCII disszociál PSII-ről, majd a PSI-hez kapcsolódva az elnyelt energiát a PSI-re továbbítja. Ha a PSI abszorbeál relatíve több fotont (a PQ-pool oxidált állapotú), akkor a foszforilált LHCII egy PQ-aktivált foszfatáz-katalizálta reakcióban defoszforilálódik, így leválva a PSI-ről visszakötődhet a PSII-re.

A felesleges energia semlegesítése kulcsfontosságú az O_2-függő fotoszintézis szempontjából. Túlzott fényen ugyanis a reakciócentrum nem képes a Chl gerjeszetett állapotait hatékonyan lecsendesíteni, ami megnöveli a gerjesztett triplet állapotba való átmenet lehetőségét. A Chl-tripletek (^{3}Chl*) azonnal reagálnak a molekuláris O_2-nel és rendkívül reaktív szinglet oxigén ($^1O_2$) keletkezik, amely további aktív oxigénformák (ROS) keletkezéséhez vezet. A ROS, a légköri oxigénnek részlegesen redukált formái az olyan normális metabolikus folyamatoknak is kísérői, mint a fotoszintézis és a légzés.

Közülük néhányan jelátvivő molekula szerepét is betöltik, azaz a védekezési folyamatok indukálásában vesznek részt. Ugyanakkor a nagy mennyiségben jelenlévő ROS komoly károsodásokat okoz a növényekben. Képesek oxidálni fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat, amely folyamatok a sejtstruktúrák károsodását és mutációkat idéznek elő.

Az Lhc-k katalizálják a szinglet állapotú gerjesztett Chl-ok (^{1}Chl*) energiájának hővé alakulását, megakadályozva a triplet kialakulását, a nem fotokémiai kioltásnak (NPQ) nevezett fényvédő mechanizmuson keresztül (*Horton és mtsai, 2005*). Az NPQ egy fény által szabályozott, az antennákhoz kötődő folyamat, amelyben a xantofilloknak fontos szerep jut. A szárazföldi növényekben a PsbS fehérje a lumen pH-jának szenzoraként működik (*Li és mtsai, 2004*). A pH megváltozására a PSII antennájában konformációváltozás vagy egyéb kölcsönhatás által indukálódik az NPQ ún. qE komponense. Ez az NPQ komponens csakis a lumen pH-ja által szabályozott, gyorsan kialakuló és gyors lecsengésű kioltást tesz lehetővé a PSII-ről leváló antennában, amelyet LHCII, CP29 és CP24 alkot (*Betterle és mtsai, 2009*). Korábban úgy vélték, hogy a qE karotinoidokhoz kötött folyamat. A legújabb kutatások azonban egy újabb modell felállításához vezettek, amely szerint az LHCII-ben ^{1}Chl* gerjesztési energiájának hővé alakulása egy fluoreszcens Chl-Chl töltés átadásnak köszönhető (*Müller és mtsai, 2010*). Az NPQ qZ komponense egy lassabban kialakuló (10-30 perc) és lassabban lecsengő (10-60 perc) kioltást takar, amely zeaxantin- (Zx-) függő. Ez a komponens a PSII monomer antennáihoz (Lhcb4-6) köthető és valószínűsítik, hogy a Chl-Zx töltésátadáson alapul (*Avenson és mtsai, 2008*).

Az qI az NPQ stressz hatására legkésőbb kialakuló kioltási komponense, magában foglalja mindazon folyamatokat, amelyek a fotoinhibíciót kísérik. A fotoinhibíció elsősorban a PSII aktivitását csökkenti és általában a D1 (és D2) kontrollált degradációjával és kicserélődésével jár együtt (*Andersson és Aro, 2001*).

Ha a megváltozott fényviszonyok hosszabb ideig fennállnak, akkor fotoakklimatizáció történik, ami a fotoszintetikus apparátus szerveződés- és működésbeli megváltozását eredményezi. Az akklimatizáció következtében megváltozik a fotoszisztémák sztöchiometriája, a komplexek egymáshoz viszonyított aránya, az LHC antennák mérete és összetétele (*Pfanschmidt, 2003*). Ha a PQ-pool redukált állapotban van, akkor az *Lhc* gének átíródása is gátolt, ami az antenna méretének csökkenését eredményezi és kialakul a „magas fényintenzitású fenotípus”. Ezzel szemben az „alacsony fényintenzitású fenotípus” esetében az antennák mérete megnövekszik az *Lhc* gének transzkripciójának serkentése révén (*Escoubas és mtsai, 1995*).

A különböző környezeti tényezők megváltozása a PSI funkcionális antennájának méretét is befolyásolja. Ez nemcsak az LHCII kötődése révén szabályozott (*Kouril és mtsai, 2005*), hanem további Lhca-k, pl Lhca5 kapcsolódásával is. Ezek általában gyengébb kölcsönhatással kötődnek a komplexhez, ami lehetővé teszi a fényviszonyok megváltozásához való gyors alkalmazkodást. Kimutatták, hogy magas fényintenzitáson az LHCI antenna összetétele úgy módosul, hogy az Lhca5 relatív mennyisége megnövekszik, az Lhca1-4 mennyisége pedig kismértékben csökken, amit transzkripciós szinten is igazoltak (*Ganeteg és mtsai, 2004*). Az Lhca5 a karotinoidok kötése révén vehet részt a PSI túlzott fénnyel szembeni védelmében.

Különböző növényekben olyan, az Lhc családhoz tartozó stressz-indukálta fehérjék jelenlétét mutatták ki, melyeknek vélhető funkciója a fotoszintetikus apparátus védelme az energiafelesleg és az ennek hatására képződő káros ^{3}Chl* ellen (*Heddad és Adamska, 2000; Jansson és mtsai, 2000; Adamska, 2001; Teramoto és mtsai, 2004*). Szekvenciájuk homológiát mutat az Lhc apoproteinekével, és 1-4 transzmembrán hélixet tartalmaznak, melyeken klorofill molekulák kötésére alkalmas konszenzus régiók találhatók. A klorofillok gyengén kötődnek hozzájuk, és a kromofórok között térbeli helyzetük miatt az energiatranszfer kis hatékonyságú, ami valószínűsíti, hogy nem a fénygyűjtés a proteinek fő funkciója. A négy hélixes PsbS a PSII-ben sztöchiometrikus mennyiségben fordul elő (2/PSII), expressziója folyamatos. Védőfunkciót tölt be azáltal, hogy részt vesz a nem fotokémiai kioltási folyamatban (*Li és mtsai, 2000*). Az Elip (early light inducable protein)-szerű proteinek közé olyan egy-három transzmembrán hélix-szel rendelkező tagok tartoznak, amelyekben megtalálható egy ún. Elip-konszenzusszekvencia az 1. számú hélixben. Ide tartoznak az egyhélixes Hlip (High light induced proteins) és Scp (small Cab-like protein) proteinek, a két transzmembrán hélixet tartalmazó Sep (Stress enhanced proteins), és Lil (Light-harvesting-like) fehérjék és a három hélixes Elip-ek. Az Elip-ek Chl *a*-t és luteint kötnek vélhető funkciójuk a tilakoidok fejlődésekor az újonnan szintetizálódott, vagy a protein turn-over (D1-protein) során szabaddá vált klorofillok megkötése (*Adamska, 2001*).

Bár a különböző Lhc családba tartozó Chl-proteinek/komplexek felépítését jól ismerjük, a sokféle Lhc fénygyűjtésben/fényvédelemben betöltött pontos szerepe sokkal kevésbé ismert. Az sem tisztázott még, hogy a különböző Chl *a/b*-proteinek eltérő izoformái milyen szerepet játszanak e folyamatokban.

4. A fénygyűjtő proteinek biogenezise és az akklimatizáció mechanizmusa

Az Lhc típusú proteinek a genomban kódoltak és a citoplazmában szintetizálódnak. Az éretlen fehérjék N-terminális végükön egy ún. tranzit peptid található, ami biztosítja e fehérjék bejutását a plasztiszba. A kloroplasztisz külső és belső burkolómembránjában található TOC/TIC (translocon of the outer/inner envelope of chloroplast) szállítórendszer közvetítésével jutnak be az organellumba (*Kessler és Schnell, 2009*). Ahhoz, hogy egy Lhc fehérje átjusson a burkolómembránon szükséges, hogy meghatározott helyeken kapcsolódjanak hozzá Chl *a* és Chl *b* molekulák (*Hoober és mtsai, 2007*). A tilakoidmembránba való beépülésének két útja lehetséges (*Schmid, 2008; Rochaix, 2011*). Az egyik lehetőség, hogy a tranzitpeptid levágódása után a fehérje a sztrómában található un. tranzit-komplexbe épül be. Ennek részét képezi egy kloroplasztisz-specifikus szignálfelismerő részecske (cpSRP) (*Falk és Sinning, 2010*), ami biztosítja az Lhc-k sztrómában való szállításához és a tilakoid membránba való beépüléshez szükséges konformáció megtartását. Feltételezik, hogy az SRP-LHC tranzit-komplexhez egy a tilakoidmembrán található SRP-receptorhoz kapcsolódik, több egyéb, eddig ismeretlen faktor társaságában. Az FtsY receptor fehérjét tartják felelősnek az érett Lhc komplexeknek a tilakoid-membránba való beépüléséért, mely GTP energia felhasználásával történik. Az Lhcb1 és Lhcb4 importjában egy másik lehetséges utat is kimutattak, amihez szükséges egy TIC-hez kapcsolt Chlid *a* oxigenáz (CAO) enzim és Chl(id) *b* jelenléte (*Reinbothe és mtsai, 2006*). A CAO legnagyobb része a belső burkolómembránhoz kötötten található. Az enzim vélhetően szerepet játszik a Chl-ok az Lhcb1 és Lhcb4 fehérjékhez való szállításában és stabilitásuk biztosításában. Az összeszerelést követően az Lhc-k vezikuláris transzporttal szállítódhatnak a tilakoid membránba.

Az Lhc fehérjék expressziója fényfüggő, és napi ritmust követ, amit a fitokróm rendszer szabályoz (*Apel és Kloppstech, 1978*). Legmagasabb aktivitást a déli órákban ér el (*Kellmann és mtsai, 1993*). Az Lhc fehérjék életideje normál körülmények között viszonylag hosszú. Bizonyos külső hatások azonban előidézhetik a degradáció felgyorsulását. A proteáz enzimeket jelenlétét kimutatták a sztrómalamellákban és a gránumok nem kapcsolt régióiban, ezért úgy vélik, hogy a tilakoidok ezen régiói a szabályozott lebontás színterei. Az LHC-k leépüléséhez számos proteáz kooperációja szükséges, azonban a teljes folyamatnak csak egyes részletei tisztázottak (*Schmid, 2008*).

Például Arabidopsis-ban kimutatták, hogy az FtsH6 proteáz felelős a magas fényintenzitás által kiváltott akklimatizációt kísérő Lhcb1 és Lhcb3 lebontásáért (*Zelisko és mtsai, 2005*).

Az, hogy az Lhc fehérjék genetikai kódja a sejtmagban található, megköveteli az kloroplasztisznak a sejtmaggal való szoros együttműködését, az organellum mindenkori szükségleteinek megfelelően. Ezért sem meglepő, hogy az Lhc-k esetében a transzkripciós szabályozás elsődlegességét valószínűsítik (*Klimmek és mtsai, 2006*), bár fehérje szinten a gének számánál több izoformát mutattak ki mind az Lhca-k (*Storf és mtsai, 2004*), mind az Lhcb-k körében (*Galetsky és mtsai, 2008*), amelyek poszt-transzlációs módosulás következtében alakulnak ki. Az Lhcb fehérjéket kódoló génekről bebizonyították, hogy szabályozásuk függ a PQ pool oxidációs állapotától is (*Escoubas 1995*). Pursiheimo és mtsai (*2001*) összefüggést találtak az LHCII foszforiláció és az *Lhcb* gének transzkripciója között. Az egyik feltételezett összekötőkapocs a TSP9 membránkötött fehérje (*Carlberg és mtsai, 2003*). Kimutatták ugyanis, hogy az LHCII-kináz által többszörösen foszforilálható fehérje képes kötődni az LHCII-höz és a PSII-LHCII szuperkomplexhez is, valamint szerepe lehet a mobil LHCII és a PSI kölcsönhatásában is (*Hansson és mtsai, 2007*) Azt is valószínűsítik róla, hogy a foszforilációs kaszkád kezdő elemeként a magba irányuló jelátvitelben szerepel. A plasztiszból a magba irányuló jelátvitelben még számos más molekula részvételét is feltételezik. Ilyenek lehetnek a reaktív oxigénformák (*Balczun és mtsai, 2005*; *Smeets és mtsai, 2008*), a Chl-szintézis intermedierek (*Wilson és mtsai, 2006*), valamint különböző foszfoproteinek és protein kinázok (*Escoubas és mtsai, 1995*). A kloroplasztiszban tehát több olyan mechanizmus áll rendelkezésre, amelyek segítségével az organellum képes érzékelni a változó környezeti feltételeket. A beérkező jelek integrációját követően pedig szabályozza a megfelelő válasz kialakulását, ellensúlyozva a stresszhatásokat, elősegítve az akklimatizációs folyamatokat (*Pfannschmidt és mtsai, 2009*).

5. Cd-toxicitás a növényekben

A nehézfémek közül néhány a növények számára fontos mikroelem, mások, mint a Cd is, toxikusak. Természetes környezetben a Cd kísérő fémként fordul elő az ólom és cink mellett (*Baker és mtsai, 1990*). Talajokba jutása leginkább különböző ipari és mezőgazdasági tevékenységeknek tulajdonítható. Az erőművek a fém- és műanyagipar, a közlekedés és a bányászat éppúgy növeli e toxikus nehézfém környezeti előfordulását, mint a szennyvíziszapos trágyázás, továbbá bizonyos növényvédőszerek és műtrágyák

használata. Széleskörűen használják a Cd-ot a galvanizáláshoz, műanyagok és festékek stabilizálására és a nikkel-cadmium elemek előállítása során.

A növények számára a Cd felvehetősége függ a talaj pH-jától, a redoxpotenciáltól, a hőmérséklettől, az esetleges kelátorok jelenlététől (*Sanita di Toppi és Gabrielli, 1999*). A Cd vízben oldott formában a gyökéren keresztül vevődik fel olyan transzmembrán karrierek segítségével, amelyek más, a növények számára fontos fémek felvételéért felelősek. A Cd ezért e fémekkel kompetícióban áll a felvétel során, vagyis csökkenti hozzáférhetőségüket a talajoldatban (*Prasad, 1995*, *Siedlecka, 1995*), így megzavarja a növény víz- és ionháztartását (*Barceló és Poschenrieder, 1990*). Az ionháztartásban okozott zavarai közül ki kell emelnünk, hogy gátolja a vas felvételét (*Alcantára és mtsai, 1994*) és transzlokációját a hajtásba (*Siedlecka és Krupa 1999; Fodor és mtsai, 2005*). A növény által felvett Cd nagy része a gyökérben marad, de egy része a hajtásba is feljut (*Clemens, 2006*, *Siedlecka, 1995*). Hatására a gyökér és a hajtás is csökkent növekedést mutat. A Cd ugyanis a sejtfalszintézise során a középlemezhez kapcsolódik és növeli a pektinláncok közötti keresztkötések számát, ezáltal csökkenti a sejtfal elaszticitását, gátolja az elongációs növekedést. Kötődése a sejtfal Ca^{2+}-kötő helyeihez szintén gátolja a sejtfal megnyúlását (*Webster és Gadd 1996*). A Cd növeli továbbá az abszcizinsavszintet a levelekben, kiváltja a sztómák záródását és csökkenti a transpirációt (*Sanita di Toppi, Gabrielli, 1999*). Közvetlen és közvetett hatásai révén számos metabolikus folyamatot gátol, köztük a fotoszintézist is (*van Assche és Clijsters, 1990, Sanità di Toppi és Gabbrielli, 1999, Rodríguez-Serrano és mtsai, 2009*).

5.1. A Cd hatása a fotoszintetikus aktivitásra

A közepes Cd-koncentrációnak kitett növényekben a levelekbe jutó Cd nagymértékben gátolja a fotoszintézist (*Krupa és Baszynski 1995, Mysliwa-Kurdziel és mtsai. 2002*). Kimutatható mindkét fotoszisztéma aktivitásának, továbbá az ATP szintézisnek és a szénasszimilációnak csökkenése is. Ez utóbbi a sztómazáródáson kívül a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz/oxigenáz (Rubisco) gátlásával is összefüggésben lehet (*Stiborová, 1988*).

A Cd PS II-ben megnyilvánuló káros hatásainak hátterében a fehérjék aktív helyeihez való asszociációjának van kulcsszerepe. A PSII donor oldalán bekövetkező gátlás annak köszönhető, hogy a szuperkomplex felépülése közben a vízbontó komplex esszenciális Ca-kötő helyét foglalja el (*Sigfridsson és mtsai, 2004*). A vízbontó katalitikus

centrum a komplex legkésőbb beépülő eleme. Ezután történik a PSII fotoaktivációja, amelyhez a komplex kofaktorain kívül (Mn^{2+}, Ca^{2+}, Cl^{-}) fényre is szükség van. A PSII-t tartalmazó élőlényeknél ez a fotoaktiváció gyakran ismétlődő folyamat, figyelembe véve a katalitikus centrumot hordozó D1 protein gyors turnoverét (*Faller és mtsai, 2005*). A Cd donor oldali gátlásának másik formája az Y_Z oxidációjának megakadályozásában nyilvánul meg. Valószínű, hogy az Y_Z fenolos oxigénje és a közvetlen közelében található Ca^{2+} ion között lévő vízmolekulák kiszorítása révén játszik a Cd ebben szerepet, megbontva a fenolos hidrogén koordinálását végző érzékeny struktúrát. Ugyanakkor a Cd-nak az akceptor oldalon megnyilvánuló hatása is van. Valószínűsíthető, hogy a Cd a Q_B protonációban résztvevő aminosavmaradékhoz kötődve akadályozza a protonációt (*Axelrod és mtsai, 2000*). A PSII *core* részében található Cit b_{559} redoxpotenciálját is csökkenti a Cd-kezelés. A PSI-ben folyó elektrontranszportot a nehézfémstressz/Cd hatások sokkal kevésbé befolyásolják (*Siedlecka és Baszynski, 1993*).

Normál megvilágítás mellett is megbomlik az egyensúly az abszorbeált fény és a hasznosítható energia között a Cd-nak a fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt gátló hatása miatt. Fényfelesleg alakul ki, ami elősegíti reaktív oxigén formák (ROS) keletkezését (*Benavides és mtsai 2005*), amelyek károsítják a membránlipideket, a fotoszintetikus apparátus fehérjéit, fémcentrumait. A redox kapacitással nem rendelkező nehézfémek, mint a Cd is elősegítik a szabaddá vált vegyértékváltó Fe és Cu oxidált állapotának fenntartását a glutation (GSH) pool csökkentése révén, mely többféle mechanizmus eredményeként jöhet létre. A fitokelatin szintézis és a keletkező kelátorok Cd általi megkötése csökkenti a GSH szintet. A glutation reduktáz gátlása is szerepet játszhat ebben, aminek oka lehet a megemelkedett aszkorbát szintézis vagy a Cd a glutation reduktázhoz való kötődése. A lecsökkent GSH szint következtében a Fe^{3+} és Cu^{2+} ionok $OH^{\bullet}$ gyökök képződését generálják a Haber-Weiss reakció során. Ezen túlmenően, a Cd-stressz a különböző enzimatikus és nem-fotokémiai védelmi mechanizmusokat is képes gátolni (*Gallego és mtsai, 1996; Latowsky és mtsai, 2005*)

5.2. A Cd hatása a fotoszintetikus struktúrákra

A Cd-kezelés amellett, hogy csökkenti kloroplasztiszok számát, a belső szerkezetüket is befolyásolja. Cd hatására szabálytalanul elhelyezkedő gránumokat, a sztróma lamellák redukcióját, tilakoid tágulást és a plasztoglobulusok számának emelkedését figyelték meg (*Barceló és mtsai, 1988*).

A Chl-tartalom csökkenése a Chl-tartalmú pigment-protein komplexek kialakulását is befolyásolja (*Mysliwa-Kurdziel és mtsai, 2002a*). A Cd-stressz során tapasztalt Chl *a/b* arány módosulása a PS-ek és az azokat felépítő Chl-proteinek relatív arányainak megváltozását tükrözi. A Chl-tartalmú komplexek közül a PSI bizonyult a legérzékenyebbnek (*Sárvári, 2005; Fagioni és mtsai, 2009*). Proteomikai vizsgálatokban érintőlegesen beszámoltak egyes Lhc protein foltok csökkenéséről is (*Kieffer és mtsai, 2009; Farinati és mtsai, 2009; Durand és mtsai, 2010*). Kevés irodalmi adatot találunk a Chl-protein interakciók Cd stressz hatására bekövetkező változásairól is. Több növényben is kimutatták például az LHCII trimerizációjának csökkenését (*Krupa, 1988, Fagioni és mtsai, 2009; Qureshi és mtsai, 2010*), és ezzel egyidejűleg a PSII degradáció/reszintézis ciklusának felgyorsulására utaló változásokat is leírtak (*Qureshi és mtsai, 2010*). Cd kezelés hatására ugyanis egy un. PSII szubkomplex mennyisége megemelkedett mustár növényekben, amely kompexről valószínűsítik, hogy a PSII lebomlása során keletkező egyik köztes állapotot képviseli.

5.3 A Cd hatása a génexpresszióra

A Cd-stressz gátolja mind a metabolikus folyamatok, mind az elektrontranszportlánc működését, így az abszorbeált energia feleslegben van a metabolikusan felhasznált energiához képest, ami fénystresszt és ezzel együtt oxidatív stresszt okoz. A fotoszintetikus folyamatok kiegyensúlyozatlanságát a rendszer komponensei, elsősorban a PQ-pool és a tioredoxin redox állapota alapján érzékeli (*Pfannschmidt, 2003, Pfannschmidt és mtsai 2009*). Ha a fényfelesleg, illetve a PSI és PSII működésének kiegyensúlyozatlansága hosszabb ideig fennáll és a növény képes a túlélésre, akkor a gyors metabolikus regulációs folyamatokat felváltják a génexpresszió változásával járó akklimatizációs folyamatok. Ezek hatására a komplexek mennyisége és szerveződése, valamint a *core* komponensek és antennák aránya változik meg (*Wilson és mtsai, 2006*).

Az akklimatizációs folyamatokat közvetítő szenzor(ok)nak képesnek kell lenniük az oxidációs állapot és a ΔpH megváltozásait átalakítani olyan biokémiai jellé, amely a sejtmagban zajló génexpressziót szabályozza. A kloroplasztisz metabolikus állapotát a citoszolba és a magba közvetítő jelátvitelben többféle mechanizmus részvétele feltételezhető. A Cd hatására bekövetkező oxidációs állapot változások közvetítésében egyaránt szerepelhet a kloroplasztisz ditiol- és glutation szintje, reaktív oxigénformák, ATP/NADPH arány és a szénhidrátok mennyisége (*Rolland és mtsai, 2006; Pogson és*

mtsai, 2008; Kleine és mtsai, 2009). Az oxidációs állapottól befolyásolt Cit b_6f komplex másodlagos szerkezetét érintő változások szintén részt vehetnek a szignalizációban. Bár folyamatosan fedezik fel a Cd-stressz szignalizációban részt vevő elemeket, a pontos mechanizmust még korántsem ismerjük. Kimutatták pl. a MAP kinázok aktivitásának növekedését (*Yeh és mtsai, 2007*), és különböző transzkripciós faktorok aktiválódását is (*Weber és mtsai, 2006*). A génexpressziót vizsgáló kísérletek során feltártak egy sor Cd-stressz által szabályozott gént, amelyek között megtalálhatóak a DNS duplikációt követő „mismatch”-ek javítását végző fehérjék génjei is (*Liu és mtsai, 2008*), a proteolitikus lebontásban szereplő elemek (*Djebali és mtsai, 2007*), valamint az oxidatív stresszválaszban (*Smeets és mtsai, 2008*) és vashiány hatására indukálódó gének is (*Hodoshima és mtsai, 2007*).

A Cd-regulált gének átfogó analízise azt mutatta, hogy a Cd által befolyásolt gének különböző funkcionális kategóriákhoz rendelhetők (*Fusco és mtsai, 2005, Herbette és mtsai, 2006*). Protein kinázok és transzkripciós faktorok megjelenése a kezelés elején a szignáltranszdukciós utak gyors aktiválódását jelenti. Kimutatható volt a kloroplasztisz nagyszámú fotoszintézis génjének gátlása már a 6 órás mintavételnél, amíg a sejtmagban kódolt fotoszintetikus fehérjék génexpressziója 30 óra elteltével mutatott csökkenést. A Cd által negatívan szabályozott gének között megtalálhatók voltak a Chl-szintézisben részt vevő enzimek, a PSI és PSII fehérjéi, Lhcb fehérjék és a Calvin ciklus enzimei is (*Herbette és mtsai, 2006*). A stresszválaszban szerepet játszó, védő funkcióval rendelkező fehérjék génjeinek sora mutatott aktiválódást a Cd hatására. Közéjük tartoznak hősokk fehérjék, chaperonok, amelyek a fehérjelebomlás megakadályozásában játszanak fontos szerepet, valamint az oxidatív stressz elleni védelemben szereplő enzimek.

Bár a Cd hatásait széles körben dokumentálták a fotoszintézis strukturális és funkcionális megváltozásait érintő publikációkban, a fotoszintetikus akklimatizációban fontos *Lhc* gének átfogó vizsgálatát célzó, a Cd génexpressziós szintű hatásait leíró munka mindezidáig nem készült.

6. A Cd és a Fe kölcsönhatása

A Cd-stressz okozta fiziológiai változások egy része összefüggésbe hozható a növények csökkent vastartalmával, ami a fotoszintetikus apparátus kialakulását is jelentősen befolyásolja (*Siedlecka és Krupa, 1999*). A Cd a gyökér-epidermiszsejtek plazmamembránjában található ferri-kelát reduktáz (Ferric Chelate Reductase Oxidase,

FRO2) működését gátolja (A*lcántara és mtsai, 1994*), mely a talaj Fe^{3+}-tartalmának szabad Fe^{2+} ionokká történő redukálását végzi. A redukált és szabaddá vált Fe^{2+} ionok a ZIP-családba (Zinc-Iron Proteins) tartozó IRT1 (Iron Regulated Transporter 1) juttatja a gyökérepidermisz szimplasztjába (*Mäser és mtsai, 2001*). A xilémben a vas valószínűleg vas-citrát komplexek formájában szállítódik. A levél mezofillum sejtjeibe azonban csak redukciót követően juthat be. A vas-citrát redukcióban a FRO6-nak tulajdonítanak szerepet (*Jeong és Conolly, 2009*), a redukált vasat pedig valószínűleg itt is a ZIP-családba tartozó vastranszporterek veszik fel (*Abadía és mtsai, 2011*). Ez utóbbiakkal kapcsolatosan ugyan nem vizsgálták a Cd hatását, feltételezhető azonban, hogy hasonló a gyökérsejtek vasfelvételére gyakorolt gátláshoz. Kimutattuk azt is, hogy a Cd-kezelt nyárfákban a kloroplasztiszok vastartalma is alacsonyabb volt (*Sárvári és mtsai, 2011*).

6.1 A vashiány hatásai a fotoszintetikus apparátusra

A vas limitált elérhetősége elsődlegesen a kloroplasztiszok struktúráját és funkcióját befolyásolja (*Soldatini és mtsai, 2000; Morales és mtsai 2001*). Ugyanis a levél vastartalmának 80%-a a kloroplasztiszokban található, nagyrészt a tilakoid membránokban, amelyek a levélben lévő Chl mintegy 60%-át tartalmazzák (*Terry és Abadía 1986*). Vashiány következtében a Chl-szintézis erősen gátolt, ugyanakkor a fiatal levelek növekedése a kontrollhoz hasonló mértékű marad (*Terry és Rao, 1991*). Ezért a levélfelületre eső Chl tartalom lecsökken és kialakul a vashiány jellegzetes tünete, a „klorózis”. A Chl-bioszintézis számos lépéséről feltételezik, hogy vasigényes folyamat (*Terry és Abadía, 1986*). Így pl. a folyamat prekurzorának, a δ-amino-levulinsavnak a szintézise is vasat igényel (*Miller és mtsai, 1982; Yu és Miller, 1982*). Továbbá a vas szerepet játszik a porfirin szintézis későbbi reakcióiban is, a koproporfirinogén III → protoporfirinogén IX átalakulásban (*Lascelles, 1975; Hsu és Miller, 1970*) és a Mg-protoporfirin IX-monometilészter → protoklorofillid átalakulásban is (*Spiller és mtsai, 1982; Tottey és mtsai, 2003*). A klorotikus levelek sárgulása annak is köszönhető, hogy a Chl/karotinoid arány lecsökken a levelekben. A karotinoidok közül különösen a xantofillok játszanak fontos szerepet a vashiány következtében fellépő fényfelesleg eltávolításában. Kimutatták ugyanis, hogy a vashiányos levelek de-epoxidációs indexe is megemelkedik, jelezve a violaxantin ciklus aktiválódását (*Morales és mtsai, 2000; Donnini és mtsai, 2006)*.

A levél fotoszintetikus aktivitását a vashiány a Rubisco aktivitásának és génexpressziójának gátlásán keresztül is befolyásolja (*Winder and Nishio 1995; Ferraro et al. 2003*). Azt is kimutatták, hogy vashiány következtében egyaránt csökken a PSII maximális és aktuális kvantumhatékonysága (*Morales és mtsai, 1991; Donnini és mtsai, 2003*). Ez utóbbi az NPQ megemelkedésével együtt jelzi a stressz hatására kialakuló fotoinhibíciót és fényfelesleg káros hatásainak kivédésére szolgáló mechanizmusok aktiválódását (*Abadía és mtsai, 1999; Larbi és mtsai, 2006*). A vas esszenciális alkotóelem több komplexben is: a PSII reakció centruma és a Cit b_{559}, a Cit b_6f komplex hemjei és Rieske Fe-S centruma, valamint a PSI vas-kén proteinjei és a ferredoxin is tartalmaz vasat. Ez különösen érzékennyé teszi a tilakoid biogenezist vashiány esetén. A vas csökkent elérhetősége a tilakoidok szerkezetében, polipeptid összetételében jelentős átalakulásokat indukál. Viszonylag kevesen vizsgálták hogyan befolyásolja a vashiány a magasabbrendű növények fotoszintetikus apparátusának szerveződését. Cukorrépában proteomikai vizsgálattal kimutatták, hogy a PSI, PSII és a Cit b_6f komplex fehérjéinek mennyisége is jelentően lecsökkent (*Andaluz és mtsai, 2006*). Ugyanakkor a membránokhoz kapcsolódó Rubisco mennyisége megemelkedett. Találtak továbbá egy enzimkomplexet is, amelynek a tilakoidokhoz való kapcsolódása vashiány következtében megnövekedett. A kimutatott enzimek az aminosav és szerves sav anyagcserében vesznek részt és funkciójuk vélhetően a vashiányos tilakoidok oxidációs egyensúlyának fenntartása lehet.

A vas elérhetőségének csökkenésére legérzékenyebben a PSI komplex reagál. Vashiányos spenót levelében a PSI *core* proteinek és az antenna alkotóinak mennyisége is jelentősen lecsökken. Azt is megfigyelték, hogy a stressz hatására megváltozott a PSII antenna alkotóinak aránya (*Timperio és mtsai, 2007*). Kimutatták a PSI antenna reorganizációját (*Moseley és mtsai, 2002*) és az LHCII antenna részleges leválását a PSII-ről (*Morales és mtsai, 2001)*. Szintén jellegzetes az LHCII monomerizációja vashiány hatására, amiről feltételezik, hogy a fényfelesleg káros hatásainak kivédésében fontos védekezési mechanizmus része lehet (*Timperio és mtsai, 2007; Qureshi és mtsai, 2010*). A csökkent Chl-tartalom és a Zx-tartalom egyidejű emelkedése valószínűleg befolyásolja az Lhc fehérjék trimerizációs képességét. A vashiány következtében fellépő fotoinhibíció a PSII reszintézisét vonja maga után. Ennek egyik bizonyítéka vashiányos mustár növényekben a lebomlás egyik köztes állapotát képviselő un. PSII szubkomplexek megemelkedett akkumulációja (*Qureshi és mtsai, 2010*). A Cd-kezelés illetve a vashiány következményeként megfigyelt változások összehasonlítása információkat adhat arról, hogy Cd-stressz tüneteit a Cd közvetlen hatásai vagy az általa indukált vashiány okozza-e.

III. Célkitűzések

A növények helyhez kötött életmódjuk miatt főként biokémiai mechanizmusok révén alkalmazkodnak a változó környezeti feltételekhez. A különböző stresszorok a növényekben fiziológiai és regulációs válaszokat egyaránt aktiválnak. A fotoszintézissel kapcsolatos regulációs válaszokról Cd-stressz esetében keveset tudunk. A disszertáció célja, hogy a Chl-protein komplexek szerveződésében, pigment- és fehérjeösszetételében Cd hatására bekövetkező változásokat, valamint azok okait és fiziológiai jelentőségét feltárja.

A Cd-indukált vashiány Cd-stresszben betöltött jelentőségét a nagy biológiai produktivitású cukorrépán vizsgáljuk. Arra keressük a választ, hogy a vastartalom redukciója mennyiben járul hozzá a Cd-stressz pigment-protein komplexeket érintő tüneteihez. A regenerációra képes nyárfa növények esetében az akut Cd-stressz pigment-protein komplexekre gyakorolt hatásait a regeneráció szempontjából kívánjuk megvizsgálni. A nyárfa, mint fás szárú genetikai modellnövény, alkalmas arra is, hogy információt kapjunk a pigment-protein komplexek összetételében és szerveződésében bekövetkezett változások szabályozási szintjéről.

Megvizsgáljuk a BN-PAGE-sel elválasztott pigment-protein komplexek pigment (HPLC) és protein (SDS-PAGE, nanoHPLC) összetételét cukorrépában a Cd-stressz és a vashiány tüneteinek összehasonlítása érdekében.

A BN-PAGE-el elválasztott nyárfa tilakoid-komplexek szerveződésének és összetételének (SDS-PAGE) feltárásával választ keresünk az akut Cd stressz által előidézett változásoknak a regenerációban betöltött szerepére.

Az *Lhc* géncsalád tagjainak, az Lhca és Lhcb fehérje-izoformák génjeinek, transzkripciós vizsgálatával (qRT-PCR) kívánjuk feltárni az akut Cd-stressz során tapasztalt, elsősorban az antennához köthető akklimatizációs folyamatok szabályozását különböző fejlettségű levelekben.

IV. Anyag és módszerek

1. Növénynevelés

A cukorrépa növényeket (*Beta vulgaris* L. cv. Orbis) növénynevelő kamrában 80% relatív páratartalom mellett, 16 óra 23 ^{o}C-os fényperiódus (350 µmol foton m^{-2} s^{-1}) és 8 órás 18 ^{o}C-os sötétperiódus alkalmazásával neveltük. A magokat vermikulit közegben csíráztattuk 2 héten keresztül. Ezután a csíranövényeket 2 hétig 1/2 töménységű Hoagland tápoldatoton (2,5 mM KNO_3; 2,5 mM $Ca(NO_3)_2$; 1,0 mM $MgSO_4$; 0,5 mM KH_2PO_4; 23,2 µM H_3BO_3; 9,20 µM $MgCl_2$; 0,28 µM $ZnSO_4$; 0,24 µM Na_2Mo_4; 0,16 µM $CuSO_4$, a vasforrás 45 µM Fe(III)-EDTA volt) előneveltük. A kezelésekhez a növényeket 20 literes, a fenti tápoldatot tartalmazó műanyag edényekbe tettük át, egy edényben 4 növényt neveltünk egyszerre. A Cd-kezelt növények tápoldata 10 µM $CdCl_2$-ot is tartalmazott. A vashiányos növények tápoldatába 1 g l^{-1} $CaCO_3$-ot is tettünk a vashiányos talajban lévő pH 7,7 viszonyoknak megfelelő közeg biztosításához. A mérésekhez a 10 napos növények fiatal, de már kifejlett méretű leveleit használtuk fel. A növénynevelést háromszor ismételtük, kezelésenként 4-4 növényt használva a mintavételhez.

A mikroszaporított nyár növényeket (*Populus jacquemontiana* var. *glauca* (Haines) Kimura, cv. Kopeczkii) ¼ töménységű Hoagland tápoldaton neveltük, amelyben a Fe-forrás 10 µM Fe(III)-citrát volt. A növénynevelő-kamrában 14/10 órás fény (120 µmol foton m^{-2} s^{-1})/ sötét periódusok követték egymást, rendre 25/22 ^{o}C szabályozott hőmérséklet és 70/75% relatív páratartalom mellett. A növények egy részét 4 leveles (~4 hetes) koruktól 10 napig (**Cd10**), valamint 3 hétig (**Cd21**) a fenti tápoldatban adott 10 µM $Cd(NO_3)_2$-tal kezeltük. A mérésekhez mintát vettünk a növények alsó és felső levélemeleteiből is: a kezelések előtt már kifejlett, fotoszintetikusan kompetens (-2) levelekből, és a kezelések alatt fejlődött (+2) levelekből is. A kísérletet háromszor végeztük el, 3-5 párhuzamos növényi mintán, amelyeket külön edényekben neveltünk.

2. Iontartalom meghatározás

A minták analízise a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrumának Élelmiszertudományi Minőségbiztosító és Mikrobiológiai Intézetének elemanalitikai laborjában, a makroelemek esetében ICP-OES (induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométer, Thermo-Fisher, USA, kimutatási határ: 1-10 ppb), a mikroelemek

esetében ICP-MS (induktív csatolású plazma tömegspektrométer, Perkin Elmer, USA, kimutatási határ: 1 ppt) készülékekkel történt. A módszer alkáli- és alkáli-földfémek, félfémek, átmeneti fémek, valamint a nemfémes elemek közül a S és P mérésére alkalmas.

A mintákat 60 °C-os szárítószekrényben az állandó száraztömeg eléréséig szárítottuk. A savas feltárás során 1 g szárított levélmintát 10 ml tömény salétromsavban egy éjszakán át inkubálták. Az előroncsolást 30 percig 60 °C-on végezték, amit a 90 percig tartó, 120 °C-on végzett főroncsolás követett 3 ml hidrogénperoxid oldat (30%) hozzáadásával. A kapott oldatot mérés előtt ioncserélt vízzel 50 ml-re feltöltötték, és MN-640W jelű szűrőpapíron szűrték.

3. A fotoszintetikus pigmentek analízise

3.1 Chl-tartalom meghatározás

A levelek különböző részeiről 5,5 mm átmérőjű levélkorong mintákat vettünk dugófúróval. A korongokat 80%-os acetonban dörzsöltük el. A homogenátumot 5 percig 10000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszóból kéthullámhossz módszerrel meghatároztuk a Chl-tartalmat (*Porra et al, 1989*). A fényszórás kiküszöbölésére korrekciót végeztünk a 800 és 730 nm közötti abszorpció-emelkedés mértéke alapján. A számolások alapegyenletei a következők:

$$\text{Chl } a \ (\mu\text{g cm}^{-2}) = 12{,}25 \times E_{663{,}6} - 2{,}55 \times E_{646{,}6} \times \text{térfogat} \times \text{hígítás/felület}$$

$$\text{Chl } b \ (\mu\text{g cm}^{-2}) = 20{,}31 \times E_{646{,}6} - 4{,}91 \times E_{663{,}6} \times \text{térfogat} \times \text{hígítás/felület}$$

(E_{xxx} az indexben jelzett hullámhossznál mért abszorpció.)

3.2 Karotinoid-tartalom meghatározás

Azonos felületű levélkorongokat folyékony N_2-ben dörzsöltünk el Na-aszkorbát jelenlétében, majd a karotinoidokat 100% acetonnal oldottuk ki. Az elegyet fél óra, -20°C-on való állás után 0,2 µm-es molekulaszűrőn engedtük át, és 5 ml-re töltöttük fel.

Az izolált komplexek karotinoid tartalmának a meghatározásához a mintákat 0,2 µm-es fecskendős molekulaszűrön (Teknokrama, OlimPeak) engedtük át, majd kromatográfiás oszlopra vittük fel (Sep-Pak Plus C18, WAT020515, Waters Corporation). Az oszlopot előzőleg 100%-os, majd következő lépésben 80%-os metanollal egyenlítettük ki, hogy a vizes fázisban lévő komplexek a felületén kellően adszorbeálódjanak. A pigmenteket ezután 100%-os acetonnal eluáltuk.

Az acetonos oldatok karotinoidok koncentrációját Rivas és mtsai (*1989*) által felállított HPLC berendezéssel határoztuk meg, az eredeti módszer kis módosításával. A pigmenteket 100 x 8 mm-es Novapak C18 kromatográfiás oszlopon (Waters Corporation) választottuk el. A mintát Rheodyne 7010 20 µl-es térfogatú injektoron (Thermo Scientific) keresztül fecskendeztük a berendezésbe, a mobil fázis 1.7 ml min^{-1} sebességű mozgását a Waters M45 magas nyomású pumpa biztosította. Az elválasztás során először 3 percig acetonitril:metanol:trietil-amin=7:1:0.007 oldószerelegyet, ezt követően 5 percig acetonitril:metanol:víz:etil-acetát:TEA= 7:0,96:0.04:8:0.007, végül pedig 7 percen keresztül újra az elsőként alkalmazott oldószerelegyet használtuk. A kromatográfiás görbe csúcsait 450 nm-nél Shimadzu UV-VIS spektrofotométerrel detektáltuk. A pigmentek mennyiségi meghatározását – ismert koncentrációjú tisztított pigmentekkel végzett kalibrációra alapozva – a kromatográfiás görbe csúcsainak integrálásával végeztük.

4. A fotoszintetikus aktivitás jellemzése fluoreszcencia indukcióval

A Chl *a* fluoreszcencia indukciót PAM 101-102-103 fluoriméterrel (Heinz Walz GmbH, Germany), intakt növényeken mértük. A leveleket 30 percig sötétadaptáltuk, majd az F_0-szintet a szaggatott mérőfény (intenzitás<1 µmol m^{-2} s^{-1}, modulációs frekvencia 1,6 kHz) bekapcsolása után határoztuk meg. A maximális fluoreszcencia intenzitást sötét- (F_m), illetve fényadaptált (F_m') állapotban 0,7 s-os, a PSII elektrontranszportot telítő fehér fényfelvillanást (3000 µmol m^{-2} s^{-1}, fényforrás: KL 1500 electronic, Schott, Germany) követően mértük. A kioltási vizsgálatokhoz aktinikus fényt (100 µE m^{-2} s^{-1}, 100 kHz) használtunk. A paramétereket Hendrickson és mtsai (*2005*) és Baker (*2008*) szerint számoltuk:

A PSII maximális kvantumhatékonysága: $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$,

A PSII aktuális hatékonysága: $\Delta F/F_m'=(F_m'-F_t)/F_m'$,

Nem-fotokémiai kioltás: $NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$,

Konstitutív hődisszipáció/fluoreszcencia: $\Phi_{f,D}=F_t/F_m*(F_v/F_m)/(F_v/F_{mM})$;

ΔpH és xantofill-ciklus alapú kioltás: $\Phi_{NPQ}=(F_t/F_m'-F_t/F_m)*(F_v/F_m)/(F_v/F_{mM})$;

Összes PSII RC hatékonysága: $\Phi_{PSII}=(1-F_t/F_m')*(F_v/F_m)/(F_v/F_{mM})$;

Inaktív PSII RC-ok általi hődisszipáció: $\Phi_{NF}=1-(\Phi_{PSII}+\Phi_{f,D}+\Phi_{NPQ})$;

ahol F_0 és F_m, a sötétadaptált levél minimális és maximális fluoreszcenciája, F_t és F_m' pedig a fényadaptált levél aktuális (t időpontban mért) és maximális fluoreszcenciája, Fv – a változó fluoreszcencia, F_v/F_{mM} – referencia kvantumhatékonyság (átlagos kontroll kvantumhatékonyság).

5. A tilakoid-membránok izolálása

Az izolálást Jansson és mtsai (*1997*) szerint végeztük, kis változtatásokkal. Az izolálás során 0-2 °C-ra hűtött oldatokkal dolgoztunk, a centrifugálási lépéseket 4 °C-on tartott készülékben végeztük. A leveleket késes homogenizátorral (Waring Blendor) előhűtött edényben és izoláló pufferben (50 mM Tricin/KOH (pH 7,8), 2 mM $MgCl_2$, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 0,1% BSA) háromszor 5 s-ig homogenizáltuk. A homogenátumot négy réteg gézen és két réteg Miracloth-on szűrtük, majd a kontroll plasztiszokat 3 perces 1000 g-s, a kezelteket 2000 g-s centrifugálással ülepítettük ki. Ezután ozmotikus sokkal (10 mM Na-foszfát (pH 7,4)) és újracentrifugálással (7 perc, 5000 g) eltávolítottuk a borítómembránt és az oldható fehérjéket. A csapadékban kapott tilakoidokat egyszer mostuk 0,1 M szorbitolt tartalmazó 5 mM Tricin-$(CH_3)_4NOH$ (pH 7,5) pufferben. A keményítő kiülepítése érdekében a szuszpenziót 3 percig 100 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszóból kiülepítettük a tilakoidokat (10 perc 10000 g). A mintákat 40% glicerint és 2 mM Tris-maleátot (pH 7,0) tartalmazó oldatban, folyékony nitrogénben (77 K) tároltuk.

6. Klorofill-protein komplexek elválasztása Blue-native poliakrilamid gélelektroforézis (BN-PAGE) módszerrel

A tárolt membránokat kiülepítettük (10 perc 10000 g), és 330 mM szorbitolt és 250 µg ml^{-1} Pefabloc-ot tartalmazó 50 mM Bisz-Trisz-HCl (pH 7,0) pufferben mostuk (10 perc, 10000 g). A tilakoidokat (500 µg ml^{-1} Chl) 0 ^{o}C-on 30 percig 750 mM aminokapronsavat, 0,5 mM EDTA-t, 250 µg ml^{-1} Pefabloc-ot és 2% (m/v) n-dodecil-*β*-D-maltozidot (Roche, Mannheim, Germany) tartalmazó 50 mM Bisz-Trisz-HCl (pH 7,0) pufferben szolubilizáltuk. A nem szolubilizálódott anyagokat 15 perc 19000 g cenrifugálással ülepítettük ki, majd minden mintához 1/5-öd térfogatnyi 750 mM aminokapronsavat és 5% Serva Blue G-t tartalmazó elegyet adtunk.

A szolubilizált komplexeket BN PAGE-sel választottuk el. A tömörítő gél (4% akrilamid, 0,125% biszakrilamid, 0,5 M aminokapronsav, 50 mM Bisz-Trisz-HCl pH 7,0,

10% glicerin,) a polimerizációját 0,125% TEMED-et és 0,125% ammónium-perszulfát idézte elő. A szeparáló gélben (5-12% akrilamid, 0,155-0,375 biszakrilamid, 5-15% szaharóz gradiens, 0,5 M aminokapronsav, 50 mM Bisz-Trisz-HCl pH 7,0, 10% glicerin,) a polimerizáció 0,028-0,047% TEMED gradiens és 0,028-0,042% ammónium-perszulfát gradiens mellett történt. Az akrilamid/bisz-akrilamid arány 30:0,8 volt. A 10×8×0,15 cm-es géleket Mini-Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gélelektroforézis készülékbe helyeztük, anódpufferként 50 mM Bisz-Triszt (pH 7,0), katód pufferként 15 mM Bisz-Triszt, 50 mM Tricint és 0,02% Serva Blue G-t tartalmazó oldatot használtunk. Az analitikai gélekre 10-15 µl tilakoidot vittünk fel. Az elektroforézis első fél órájában 40V-os állandó feszültséget alkalmaztunk, amíg a minták bevándoroltak a tömörítő gélbe, majd áttértünk a géllaponként 5mA állandó áramerősségre 300V maximális feszültség mellett. Amikor a festékfront elérte a gél 2/3-át, a katódpuffert lecseréltük festéket nem tartalmazó katódpuferre, és folytattuk a szeparálást, amíg a festékfront elérte a gél végét.

A géleket szkenneltük, majd a Phoretix 4.1 (Newcastle-upon-Tyne, UK) program segítségével értékeltük ki a denzitogramokat. A denzitogram összepixel intenzitása arányos volt a felvitt membránok (Chl-) mennyiségével. Az egyes sávokban lévő komplexek mennyiségét úgy számoltuk, hogy az azonos membrán(Chl)-mennyiség elválasztásakor kapott sáv integrált pixelintenzitását korrigáltuk az adott mintára jellemző, levélfelületre eső Chl-tartalommal (µg cm^{-2}). A sávokat a fehérje-összetétel alapján azonosítottuk, és az azonos tilakoid-partikulumhoz tartozó komponensek mennyiségét összeadtuk.

7. A fehérjék elválasztása denaturáló SDS-PAGE-sel

A komplexek polipeptid összetételének meghatározása céljából a BN sávok protein komponenseit második dimenzióban denaturáló körülmények között választottuk el egymástól (*Laemmli 1970*).

A BN-PAGE-sel nyert gélsávokat szolubilizáló pufferben (5 mM Trisz-HCl, (pH 6,8), 2% Na-dodecil-szulfát, 2% ditiotreitol, 10% glicerin és 0,001% brómfenolkék) oldott meleg agarózzal stabilizáltuk a mintahelyen.

Az 5% akrilamidot és 0,125% biszakrilamidot, 0,125 M Trisz-HCl (pH 6,8) puffert, 0,1 % Na-dodecil-szulfátot tartalmazó tömörítő gélben a polimerizációt 0,056% TEMED és 0,112% ammónium-perszulfát idézte elő. A 10-18% akrilamid, 0,267-0,500% biszakrilamid, 5-15% szaharóz gradienst (0,375 M Trisz-HCl (pH 8,8), és 0,1% Na-dodecil-szulfátot tartalmazó szeparáló gélben a polimerizáció 0,013-0,017% TEMED gradiens és 0,04% ammónium-perszulfát mellett történt. Az akrilamid/bisz-akrilamid arány

30:0,8 volt. Az anód és katód puffer 0,025 M Triszt, 0,192 M glicint és 0,1% SDS-t tartalmazott. Az elektroforézist 20 mA/lap állandó áramerősség mellett, a jelzőfesték kifutásáig végeztük.

A géleket Candiano és mtsai. (*2008*) által kidolgozott un. „Blue silver" módszerrel festettük. A géleket 1 órát fixáltuk 50% metanolt és 2% foszforsavat tartalmazó oldatban, majd háromszor 15 percig mostuk desztillált vízzel. 1 éjszaka 10% foszforsavat, 10% $(NH_4)_2SO_4$-ot (w/v), 0,12% Coomassie G250-et és 20% metanolt tartalmazó oldatban festettük, majd a felesleges festéket desztillált vízzel mostuk ki. A festéshez használt Coomassie Blue G-250 (Serva) a fehérjékhez bizonyítottan, azok mennyiségével arányosan kötődik, vagyis az így festett gélek alkalmasak kvantitatív analízisre. A szkennelt gélek kiértékelését szintén a Phoretix programmal végeztük.

8. Pigment és fehérjekivonás a BN sávokból

A preparatív BN gélekre egyenként 300-500 µl szolubilizált tilakoid mintát vittünk fel, egy-egy azonos biológiai mintából 6-8 ilyen gélt készítettünk. Az elektroforézis után kivágott pigment tartalmú sávokat a felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A feltárást vizes közegben végzetük, a gélcsíkokat 2mM Trisz-maleát (pH:7,0) pufferben teflon homogenizátorral összetörtük, majd egy éjszakán át -20 °C-on inkubáltuk, hogy a gélmátrixból a komplexek kiszabaduljanak. A géltörmeléket 10 perces 12000 g centrifugálással ülepítettük le. A felülúszóban található pigment-protein komplexeket tartalmazó híg vizes oldatot ezután 300-500 µl végtérfogatra töményítettük Centricon (RCYM-10) csövekben, több órás 6500 g centrifugálással. Az így nyert komplexek polipeptid összetételét 2D elektroforézissel (IEF/SDS PAGE), pigmentösszetételét HPLC-vel határoztuk meg.

9. 2D-PAGE: Izoelektromos fókuszálás (IEF)/SDS-PAGE

Az izolált tilakoid vagy BN-PAGE sávokból kinyert mintákhoz négyszeres térfogatú 80% acetont és 0,07% β-merkaptoetanolt tartalmazó oldatot adtunk, majd egy éjszakán keresztül -20 ^{o}C-on inkubáltuk. A fehérjéket 10 perces 14000 g centrifugálással ülepítettük ki. A leülepedett csapadékot kétszer mostuk 80%-os acetonnal (10 perc, 14000 g) majd N_2 gázzal beszárítottuk. A csapadékot 8 M urea és 2 M tiourea, 20 mM Trisz, 4% (m/v) CHAPS, 50 mM ditiotreitol (DTT), 0,05% (m/v) n-dodecil-*β*-D-maltozid, 2 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid) és 0,5% (v/v) amfolit (pH=3-10, ill. 4-7) tartalmú

rehidratáló pufferben oldottuk fel, oly módon, hogy a mintát egy éjszakán keresztül 28 C°-on inkubáltuk. A minták fehérjetartalmát SDS-PAGE-en (ld. 6-os pont) elválasztva, Photerix-es analízissel, BSA-ból készült hígítási sor alapján határoztuk meg.

Az IEF–t az előzetes kísérletek alapján kiválasztott, 4-7 lineáris pH grádienst tartalmazó ReadyStrip IPG (Bio-Rad) géleken végeztük. A 7 cm-es kész IEF gélek passzív rehidratációja 16 órán át, 125 µl, nyomnyi mennyiségű bróm-fenolkék festéket tartalmazó rehidratáló pufferben történt, szobahőmérsékleten. A puffer fehérje tartalma a tilakoid minták esetében 75 µg volt, a BN gélsávokból kinyert minták pedig 5-20 µg fehérjét tartalmaztak.

A rehidratáció után a fehérjék fókuszálását PROTEAN IEF Cell (BioRad) elektroforézis készülékben 3 lépésben, összesen 14000 Vh-án át, 5 mA/gél maximális áramerősség mellett végeztük. 20 perc 0-250 V lineáris feszültség grádiens után 250-4000 V szintén lineáris grádiens következett, végül konstans 4000 V-os feszültségen a fókuszálás a 10000 Vh eléréséig tartott.

A géleket ezután 10 percig 6 M urea, 0,375 M Trisz-HCl, (pH= 8,8), 2% (m/v) SDS, 20% glicerin, és 2% (m/v) a fehérjék diszulfid hídjait redukáló DTT tartalmú pufferben szolubilizáltuk, majd újabb 10 percig DTT helyett 2,5% (m/v) jód-acetamidot, az –SH oldalláncokat alkiláló reagenst tartalmazó pufferben inkubáltuk, szobahőmérsékleten. A második dimenziós elválasztás SDS-PAGE-sel, Laemmli (*1970*) módszerével történt. A szolubilizált gélcsíkokat 12% akrilamidot tartalmazó gélek (8x10x1,0 cm) tetejére fektettük és felmelegített 0,5% agarózt és 0,1% SDS-t tartalmazó 50 mM Trisz-HCl (pH 6,8) pufferoldattal rögzítettük. Kádpufferként 25 mM Trisz, 192 mM glicin és 0,1% SDS tartalmú oldatot használva, az elektroforézist 20 mA/ gél áramerősség mellett, 300 V maximális feszültséggel végeztük, amíg jelzőfestékként alkalmazott brómfenolkék elérte a gél alját. A 2.D-s géleket szintén a fent említett „Blue silver” módszerrel festettük. A foltok detektálását, a gélek összehasonlítását és kvantitatív kiértékelését a PDQuest 8.0 (BioRad) programmal végeztük. A program által detektált foltokat manuálisan korrigáltuk. A kontroll és Cd-kezelt növények tilakoidjaiból készült 2.D-s gélek azonos foltjainak intenzitás különbségét t- próbával ($p<0,10$) ellenőriztük.

10. A fehérjefoltok aznosítása nano HPLC-ESI-MS/MS módszerrel

Az analízisre kiválasztott gélfoltokat automatizált EXQuest (BioRad) berendezésben vágtuk ki, majd egyenként 400 µl acetonitril:NH_4HCO_3 2:3 elegyben 30

percig hagytuk állni a Coomassie eltávolítása érdekében. Ezután 10 perces acetonitril kezeléssel dehidratáltuk a géldarabokat és szobahőmérsékleten elpárologtattuk belőle az oldószert. Ezután következett a fehérjék ún. *in-gel* emésztése 15 µl tripszin (Sequencing Grade Modified Trypsin V511, Promega, Madison) tartalmú oldattal (0.1 µg $µl^{-1}$ tripszin, 40 mM NH_4HCO_3; 9% v/v ACN). A 37 °C-on 5 órán át tartó inkubációt követően a reakciót 1 µl 1% triflour-ecetsav hozzáadásával állítottuk le.

Az emésztéssel kapott peptid-elegyet nanoflow-HPLC berendezésben (1200 series; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) választottuk el. A mintákból 3 µl-t vittünk fel az előzetes elválasztást végző 5 mm-es szilikon oszlopra 100 µl/min átfolyási sebességgel (5 µm részecskeméret; ZORBAX 300SB-C18, Agilent Technologies). A peptideket eluáció után egyenesen a nagy kapacitású ionizációs kamrába kerültek tömegspektrometriás analízisre (model HCTPlus, Bruker Daltonik). A fehérjéket az NCBInr 20110129 és a Plants_EST EST_105 adatbázisok felhasználásával a Mascot kereső programmal azonosítottuk.

11. mRNS-ek kinyerése és átírása cDNS-re

A levélmintákból 130–150 mg-ot használtunk mRNS kivonáshoz. Kvarchomok jelenlétében folyékony nitrogénben eldörzsöltük a leveleket. Az elporított levélszövetből a poliA+ RNS-eket a felületükön Oligo d(T)25-t tartalmazó mágnesgyöngyökkel (Magnetic Beads, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) izoláltuk a gyártó leírása szerint. A kinyert RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) mértük meg. Az esetleges genomi DNS szennyeződést RN-áz-mentes DNaseI (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) enzimmel bontottuk le. Az egyszálú kópia DNS (cDNS) szintézisét oligo d(T) primerekből kiindulva a RevertAid HMinusM-MuLV (Fermentas) reverz tanszkriptáz enzimmel, egy PCR ciklusban, a gyártó instrukciói alapján végeztük. Az átírt cDNS minták egy hányadát a RiboGreen-es fluoreszcens koncentráció meghatározáshoz használtuk fel, a többit pedig kis térfogatokban szétmérve -80 C°-on tároltuk a Real-Time reakciókban való későbbi felhasználásig.

12. A cDNS minták fluoreszcens mérése RiboGreen festékkel

A cDNS minták nukleinsav tartalmát a RiboGreen (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fluoreszcens festékkel detektáltuk. A festéket ugyan eredetileg az

RNS koncentráció meghatározására tervezték (*Jones és mtsai, 1998*), az egyszálú cDNS-hez is kötődik, annak mennyiségével arányosan (*Libus és Štorchová, 2006*). A mérés feltétele, hogy reverz transzkripció után maradó RNS-eket el kell távolítani. Lúgos hidrolízis után a cDNS mennyiség meghatározását 60 µl végtérfogatban (RiboGreen 200x-os hígítás, cDNS minta 4x-es hígítás), mintánként hármas ismétlésben végeztük A fluoreszcens jelet a FluoroMax-2 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) spektro-fluoriméterben 15 perces inkubációs idő elteltével mértük. A gerjesztést 486 nm-nél (résszélesség 5 nm) alkalmaztuk, a foton emissziót 510-700 nm-es tartományban, 0,5 nm-enként (résszélesség 2 nm, intergrációs idő 0,1 s) detektáltuk. A fluoreszcens görbék integrálásával kapott értékeket használtuk fel a Real-Time PCR esszékben mért cDNS mennyiség korrigálásához.

13. Real-Time PCR reakciók

Az Lhc fehérjecsalád genetikai kódja a sejtmagban található, ezért a nukleotid szekvenciákat a nyárfa (*Populus trichocarpa*) genomi adatbázisból (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) nyertük ki, a Klimmek és mtsai (*2006*) által közölt annotációk alapján. A primerek tervezéséhez a Primer3 programot (www.es.embnet.org/cgi-bin/**primer3**_www.cgi), ellenőrzésükhöz az OligoAnalyzer 3.1 programot (http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) használtuk. Minden vizsgálni kívánt gén esetében optimalizáltuk a PCR reakció kapcsolási hőmérsékletét, és a primerek koncentrációját normál/grádiens PCR reakcióban iCycler Version 2.003 PCR készülékben (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A 25 µl térfogatú reakcióelegy 2,5 µl 10X Hot Start PCR puffert; 1,5mM $MgCl_2$-ot; 0,32mM dNTP-t; 0,5–0,7 µM oligot; cDNA templátot valamint 0,05 U/µL Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq (Fermentas) DNS polimeráz enzimet tartalmazott. A reakciókat 10 perc 95 °C enzimaktiváció/denaturációs lépést követően, 40 ciklusban, 15 s 95 °C, denaturációs és 40 másodperces kapcsolási/elongációs lépések ismétlésével végeztük. A termékeket 2%-os agaróz gélben elektroforetizáltuk és etídium-bromiddal detektáltuk.

A valós idejű, kvantitatív PCR reakciókat az Applied Biosystems SBS 7000 készülékkel végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Egy kontroll növényből származó cDNS templátból 6 elemű hígítási sorozatot állítottunk elő (100x, 200x, 400x, 800x, 1600x és 3200x hígított) és valós idejű PCR reakcióban a hígítások függvényében néztük a kiválasztott fluoreszcencia küszöbértékhez tartozó ciklusszám

változását (Ct). Ez alapján választottunk minden primerpárhoz az optimális detektációs tartományba eső cDNS hígítást.

A Real-Time PCR esszéket génenként végeztük. Minden egyes primerpárral megmértük a 10 különböző cDNS mintát 3-3 ismétlésben. A reakciót, a primerek és templát hozzáadásával, a puffert, dNTP-t és DNS polimeráz enzimet egyaránt tartalmazó Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) felhasználásával végeztük 25 µl végtérfogatban. Az összemérések során előforduló esetleges eltéréseket, a qPCR reakcióelegyhez mellékelt, ROX belső referencia festékkel küszöböltük ki. Az első enzimaktiváló és DNS denaturáló lépést 40 darab, a fent leírtakkal egyező termikus ciklus követte. A termékek olvadáspontját is meghatároztuk, melynek segítségével a primerek specifikus kapcsolódását ellenőriztük.

A valós idejű reakció során mért, a referencia festék jelével korrigált, fluoreszcens jel logaritmusát, az un. ΔRn értékeket használtuk fel az esszék kiértékeléséhez, amit a LinReg (Ramakers *et al*. 2003) programmal végeztünk. A program minden egyes PCR reakció ΔRn értékeiből álló görbe lineáris szakaszát elemzi. Lineáris regresszióval (legalább 4 pontra illesztett egyenes, $R^2 \geq 0.998$) számolja ki, hogy a kiindulási cDNS elegyben a vizsgált fragment mekkora mennyiségben (N_0) volt jelen. Ehhez felhasználja az egyes reakciók hatékonyságát, amelyet az egyenes meredekségéből számol, valamint az általunk megszabott egységes küszöb fluoreszcencia értékhez tartozó ciklusszámokat, Ct értékeket. A kiindulási cDNS fragment mennyiség a következő egyenletből számolható:

$$N_{Ct} = N_0 \, eff^{Ct}$$

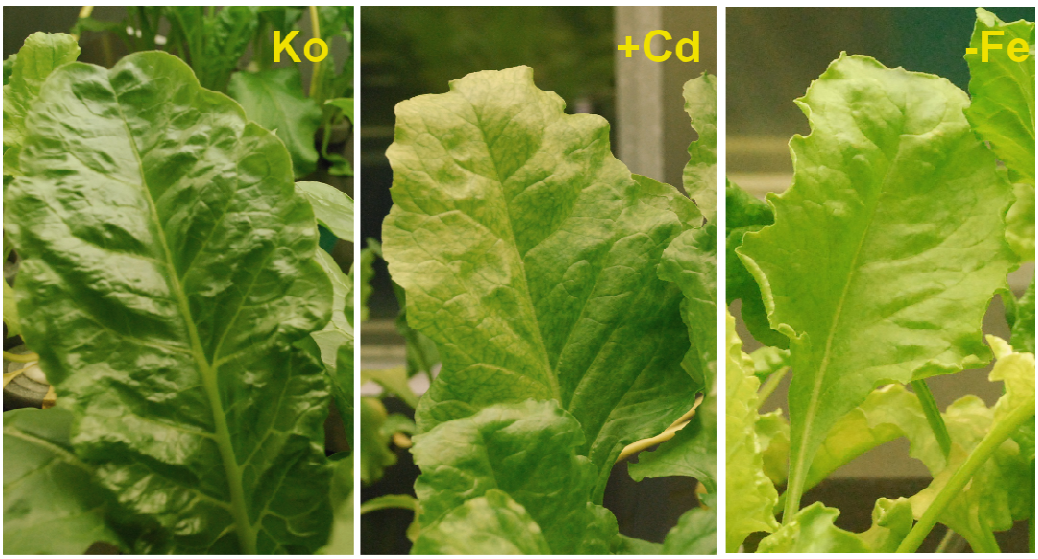
Ahol N_{Ct} a Ct-edik ciklusban jelen lévő fragment mennyiségével, N_0 a kiindulási fragment mennyiséggel arányos érték, eff. a reakció hatékonysága, Ct a küszöb fluoreszcencia értékhez tartozó ciklusszám. Az így számolt N_0 értékeket korrigáltuk a bemért cDNS mennyiségével (RiboGreen mérés alapján) és így megkaptuk a vizsgált gén relatív mRNS mennyiségét a tíz eltérő kísérleti mintában.

V. Eredmények

1. Cd-stressz és vashiány hatása a cukorrépa fotoszintetikus apparátusára

1.1. A növények általános jellemzése

A növényeket kéthetes előnevelés után, vagyis 4 leveles állapotban kontroll, Cd-kezelt és vashiányos csoportokra különítve kezeltük további tíz napig. A Cd-kezelt és vashiányos növényeken a 9-10. napra kialakultak a kezelés jellemző tünetei, az ún. „klorózis” és a növekedésgátlás (6. ábra). A mérésekhez a fiatal, ugyanakkor teljes méretüket elért leveleket használtuk fel. A kadmium hatásának kitett növényeknél a levelek sárgulása mozaikos volt, és az erek mentén zöldebbek maradtak. A vashiányos növények levelei egyenletesen világoszöldek voltak. A kezelés végén fejlődő levelek teljesen kifehéredtek, de ez utóbbiakat kizártuk a mintavételből.



6. ábra: A kontroll (Ko), Cd-kezelt (+Cd) és Fe-hiányos (-Fe) növények habitusa.

2. táblázat: A kontroll (Ko), Cd-kezelt (+Cd) és Fe extrém mértékben vashiányos (-Fe) növények leveleinek elemtartalma a levél száraz tömegére vonatkoztatva, illetve a kontroll (Ko) %-ában kifejezve.

	Ko ($\mu g\ g^{-1}$)	**+Cd (Ko%)**	**-Fe* (Ko%)**
Cd	0.8 *0167*	633	1.2 *0262*
K	53345 *165*	**81.5*** *2.1*	**62.5*** *3.1*
Ca	21853 *492*	121.1 *44.1*	158.4 *47.5*
Mg	23773 *6842*	**49.7*** *7.8*	**51.8*** *3.6*
Fe	76.0 *2.2*	**57.3*** *12.4*	**24.7*** *2.7*
Mn	418.5 *58.7*	**32.2*** *4.6*	**9.1*** *4.0*
Zn	53.7 *9.6*	95.1 *8.1*	**127.5*** *6.2*

A Cd tartalom mindegyik mintában abszolút érték
* Szignifikáns eltérés a kontroll értéktől (p>0,05).

A Cd-kezelt növények leveleiben jelentős mértékben felhalmozódott a Cd a 10. napra, a kontroll és vashiányos levelekben azonban csak elhanyagolható mennyiségben volt kimutatható. Az elemkoncentrációkban a Cd kezelés és a vashiány is némi változást okozott. Csökkent a száraz tömegre vonatkoztatott K-, Mg-, a Mn-tartalom, a Zn-tartalom pedig a vashiány hatására emelkedett (2. táblázat). A Cd-kezelt levelek vaskoncentrációja a kezelés alatt csak mérsékelten csökkent. A -Fe* levelekben viszont a Fe koncentrációja kevesebb, mint 25%-a volt a kontroll értékének.

A levelek Chl-tartalma lényeges csökkenést mutatott, mind a Cd-kezelt, mind a vashiányos növények esetében, ami a klorofill *b* pigmenteket jobban érintette (3. táblázat). A feltűnően alacsony Chl-tartalom és magas Chl *a/b* arány alapján egy extrém vashiányos növénycsoportot (-Fe*) különítettünk el, amelyet külön is vizsgáltunk.

3. táblázat: A kontroll (Ko), Cd-kezelt (+Cd), enyhén Fe-hiányos (-Fe) és erősen vashiányos (-Fe*) növények leveleinek Chl tartalma és Chl a/b aránya.

	Ko	**Cd**	**-Fe**	**-Fe***
Chl ($\mu g/cm^2$)	53,09 *3,91*	**19,65*** *7,55*	**25,73*** *1,93*	**16,94*** *4,29*
Chl a/b	3,26 *0,10*	**3,93*** *0,22*	**3,77*** *0,11*	**5,22*** *1,47*

* Szignifikáns eltérés a kontrolltól, p>0,05.

A Cd-kezelt növényekben a PSII maximális (F_v/F_m) és aktuális kvantumhatékonysága ($\Delta F/F_m$') kismértékben csökkent, a nem fotokémiai kioltás (NPQ) viszont lényegesen alatta maradt a kontrollban mért értéknek (4. táblázat). A gerjesztési energia kioltása különböző mechanizmusainak megoszlását tekintve, a ΔpH kialakulásával és a xantofill-ciklus működésével kapcsolatos kioltás (Φ_{NPQ}) és a fluoreszcencia/konstitutív hődisszipáció ($\Phi_{f,D}$) aránya alig változott, ugyanakkor a működésképtelen PSII komplexek általi energiadisszipáció (Φ_{NF}) megemelkedett a működő PSII komplexek fotokémiai hatékonyságának (Φ_{PSII}) terhére. Az extrém vashiány a Cd kezelésnél kissé erősebben csökkentette a PSII maximális és aktuális hatékonyságát (4. táblázat). A Cd kezeléssel szemben nagymértékben megnövelte az NPQ-t, komponensei közül növekedett a Φ_{NPQ} és különösen a Φ_{NF} aránya, a PSII fotokémiai hatékonyságának terhére.

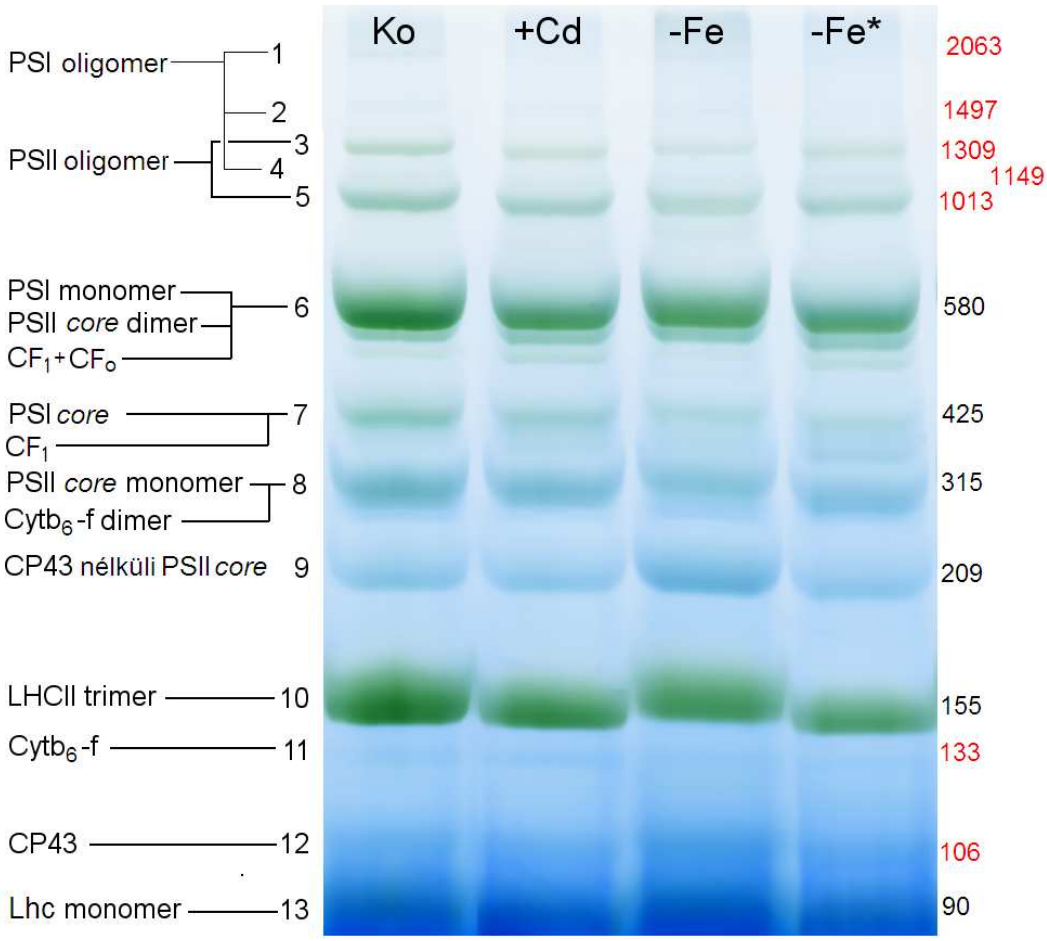
4. táblázat: A fotoszintetikus aktivitás és a nem-fotokémiai kioltás változása a Cd-kezelés (+Cd) és erős Fe-hiány (-Fe*) hatására, valamint a kioltási paraméterek %-os megoszlása.

	Ko	+Cd (Ko%)	-Fe* (Ko%)
F_v/F_m	0,746±*0,010*	94,2±*3,8*	91,2±*6,1*
$\Delta F/F_m$'	0,704±*0,009*	92,8±*3,8*	87,1±*6,1*
NPQ	0,051±*0,001*	67,4±*2,8*	156,1±*10,5*
Φ_{PSII} %	70,4±*0,9*	61,5±*2,5*	55,9±*3,7*
Φ_{NF} %	0,0±*0,0*	5,8±*0,2*	8,8±*0,6*
Φ_{NPQ} %	1,4±*0,0*	1,1±*0,0*	2,6±*0,2*
$\Phi_{f,D}$ %	28,1±*0,4*	31,5±*1,3*	32,6±*2,2*

A kezelt növények leveleiben minden paraméter értéke szingifikánsan (p>0.05) eltért a kontrolltól (Ko).

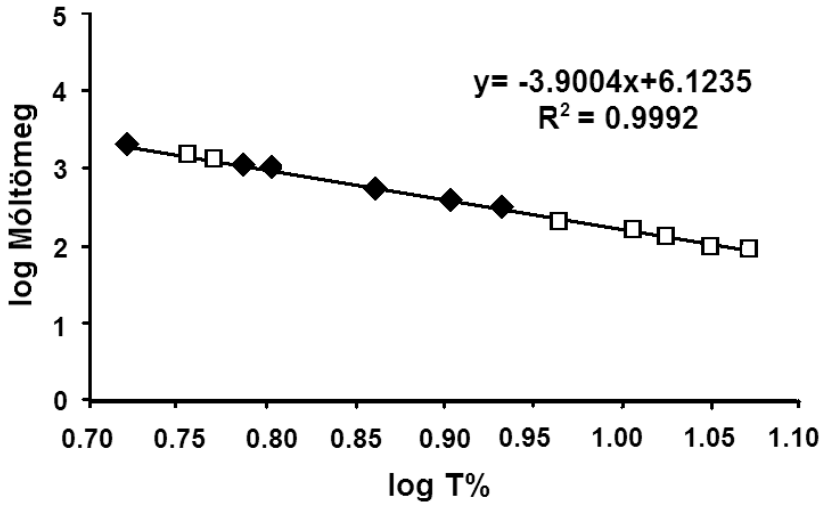
1.2. A pigment-protein-összetétel változásai a tilakoidokban Cd-stressz és vashiány hatására

A pigment-fehérje komplexeket natív körülmények között, úgynevezett BN-PAGE módszerrel választottuk szét. Az 1. dimenziós gélen 18 sávot különítettünk el, amelyek közül 13-at tudtunk azonosítani a protein-összetétel alapján (7. ábra).



7. ábra: A kontroll (Ko), Cd-kezelt (+Cd) és mérsékelten (-Fe) és erősen vashiányos (-Fe*) növények tilakoidjaiban BN-PAGE-sel kimutatható komplexek. Az komplexek ismeretlen molekulatömegét (piros számok, kDa) a Fagioni és mtsai *(2009)* által leírt sávok molekulatömegeit (fekete) standard-ként használva (ld. 8. ábra) becsültük meg.

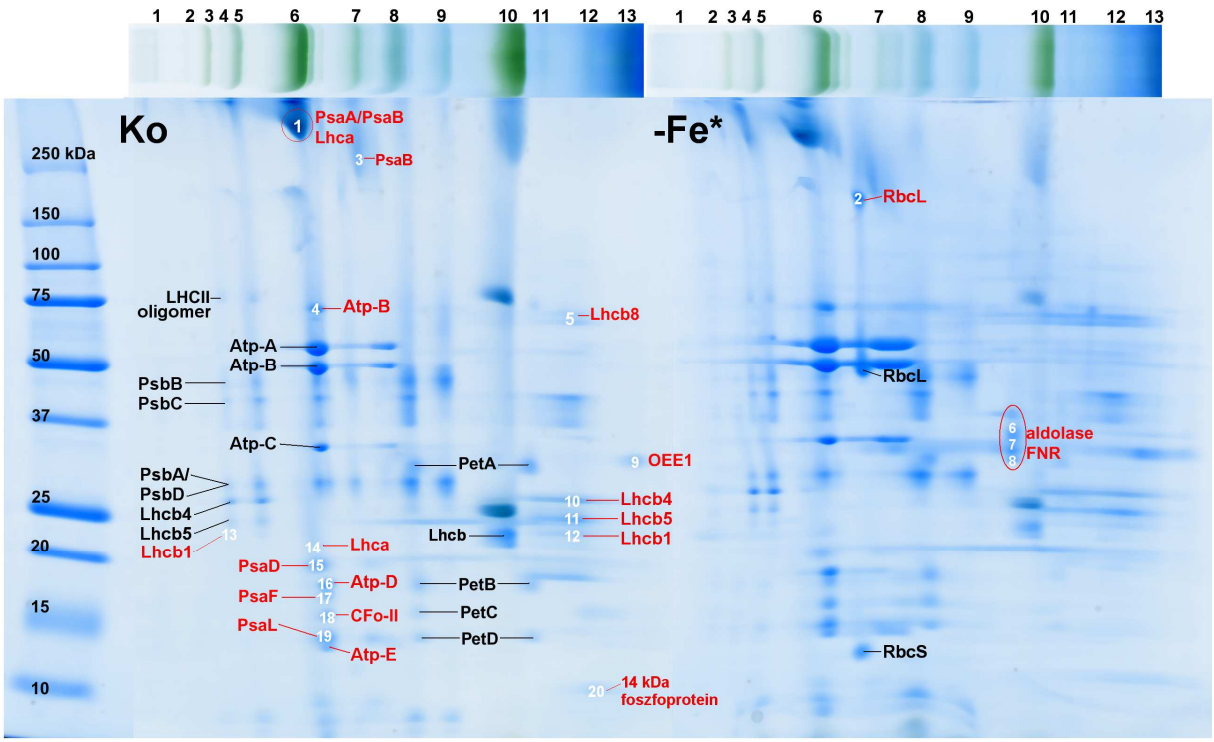
Az első 5 sáv PSI-tartalmú (pontos polipeptid összetételük kis mennyiségük miatt nem volt megállapítható), illetve PSII+kapcsoló antenna (CA)+LHCII komplexeket tartalmazó szuperkomplex (oligo). Az 580 kDa molekulatömegű sávegyüttesben a monomer PSI, az ATP szintáz és a dimer PSII volt kimutatható. A hetedik sáv PSI *core* komplexet és az ATP szintáz CF_1 részét tartalmazta. A körülbelül 315 kDa molekulatömegű sáv komponensei a PSII *core* monomer, és a Cit b_6/f dimer (ez a két komplex nem mindig jelent meg különálló sávként). A CP43 nélküli PSII komplexet a 209 kDa-os sávban találtuk, míg a róla levált monomer CP43 a 12. sávban jelent meg. Az LHCII trimerek a 155 kDa-os sávban mutathatók ki, míg a 11. sávot Cit b_6/f monomerként azonosítottuk. A leggyorsabban mozgó sávban (kb. 90 kDa) Lhc monomerek voltak találhatók.



8. ábra: Kalibráció a sávok molekulatömegének számításához. ◆: *Fagioni és mtsai (2009)* által publikált értékek, □: az egyenlet alapján számolt molekulatömegek.

A komplexeket alkotó polipeptideket második dimenzióban (2D) denaturáló SDS PAGE-sel választottuk el. A polipeptidek egy része egyértelműen azonosítható volt a hasonló gélelektroforézis rendszert használó irodalmi adatokra támaszkodva (*Suh és mtsai, 2000; Seelert és mtsai, 2003; Aro és mtsai, 2005; Nelson és Yocum, 2006*) és a hasonló komplexeket tartalmazó sávok fehérjeösszetételét összevetve. A proteinek egy jelentős részét azonban tömegspektrometriás analízissel vizsgáltuk (9. ábra). A gélből kivágott foltok tripszines emésztését követően a kapott fragmenteket nagyérzékenységű nano HPLC berendezésben választottuk el, majd ionizációt követően (Electrospray Ionisation: ESI) MS/MS analízissel mértük meg a tömegüket. A kapott adatokat több adatbázissal összevetettük és a Mascot programmal azonosítottuk a fehérjéket (5. táblázat).

A PSI monomer sáv (6-os számú) alkotói közül legnagyobb molekulatömegű az aggregált PsaA/PsaB reakciócentrum proteinek által alkotott folt. Az ATP-szintáz CF_1 részének α, és β alegységeit reprezentáló jellegzetes dupla sáv (AtpA, AtpB) az 55 kDa os régióban jelent meg, míg a γ alegység (AtpC) 35 kDa-nál volt található. A gél alsóbb régiójában megjelenő, kisebb molekulatömegű komponensek közül a 22 kDa körüli fehérjefoltot Lhca-ként azonosítottuk. Alatta voltak találhatók a PSI *core* proteinek: PsaD, PsaF, PsaL, valamint az ATP-szintáz kis molekulatömegű alkotóelemei: AtpD, CF_o-II, AtpE. A PSI *core* komplexek kíséretében (7-es sáv) már csak a CF_1 fehérjéit tudtuk kimutatni.



9. ábra: A kontroll (Ko) és az extrém vashiányos (-Fe*) tilakoidok az első dimenzióban BN-PAGE-sel elválasztott sávjai (fent) és a 2. dimenzióban SDS-PAGE-sel nyert fehérje összetétele (lent). A gél feletti számozás megegyezik a 7. ábra számozásával. Balra: Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Bio-Rad). Fekete színnel jelöltük az irodalom alapján egyértelműen azonosítható komponenseket, piros betűkkel és fehér számokkal a nanoHPLC-ESI-MS/MS módszerrel azonosított fehérjéket.

A PSII összes fehérje komponense a PSII szuperkomplex sávokban (3. és 5.) látható jól elkülönülten. A trimer LHCII-t 75 kDa-nál találtuk, bár a BN géleken az LHCII trimer komplex mérete 155 kDa-nak adódott. Mivel ez a sáv a második dimenzióban is sok Chl-t kötött, így feltételezzük, hogy emiatt futott a várttól eltérő sebességgel az elektroforézis során. Az oligomer LHCII alatt lefelé haladva következtek a CP47 és a CP43 apoproteinjei (PsbB és PsbC), majd a D2/D1 proteinek (PsbD/PsbA), valamint a kapcsoló antennát képviselő CP29 és CP26 apoproteinjei (Lhcb4 és Lhcb5). Az LHCII-t alkotó apoproteinek és az Lhc monomerek (Lhcb) a 20-30 kDa-os mérettartományba esnek. Az Lhc monomer sáv közelében találtunk egy 70 kDa tömegű aggregátumot, amely a tömegspektrometriás azonosítás szerint Lhcb8-at tartalmazott. Szintén ebben a régióban volt kimutatható a PSII vízbontó apparátusának 33 kDa-os (OEE1) fehérjéje is.

A Cit b_6/f komplex apoproteinjei, a Cit *f* (PetA), a Cit b_6 (PetB), a Rieske Fe-S-protein (PetC) és a IV alegység (PetD), dimer komplexet képezve a PSII monomer sávban jelentek meg. Monomerként külön sávot alkotva az LHCII trimer után találhatóak, ahol azonban a Rieske-féle Fe-S-fehérje hiányzik a komplexből.

5. táblázat: A fehérjefoltok azonosításának paraméterei MASCOT programmal.

Folt száma	Azonosított fehérje	MASCOT Score	Adatbázis azonosító NCBI/ EST	Mascot találat	Peptidek száma	Szekv (%)
	PSI komplex					
1	PsaB	156	gi|752032	4	2	3
	PsaA	82	gi|22091526	2	2	2
	PSI type III chlorophyll a/b-binding [Arabidopsis t.], Lhca3	163	gi|430947	3	2	10
3	PS I P700 chlorophyll a apoprotein A2, PsaB [Spinacia oleracea]	106	gi|11497524	2	2	3
15	Photosystem I reaction center subunit II, PsaD	390	gi|417544	34	6	28
17	Photosystem I reaction center subunit III, PsaF	130	gi|131187/ EG551670	3	3	10.5
19	Photosystem I subunit XI precursor , PsaL [Arabidopsis thaliana]	65	gi|5738542	1	1	6
	ATP synthase CF1 epsilon subunit [Lotus japonicus]	59	gi|13518422	1	1	15
	Lhc fehérjék					
5	LHCB4.3 (light harvesting complex PSII), LHCB8 [Arabidopsis thaliana]	124	gi|15225630/B Q489041	2	2	21
10	Type I (26 kD) CP29 polypeptide [Solanum lycopersicum]	520	gi|19184/ BQ487648	10	7	42
11	LHCB5; chlorophyll binding, CP26 [Arabidopsis thaliana]	104	gi|15235028	2	2	9
12	LHCII type I CAB-40, LHCB1 (Nicotiana tabacum)	74	gi|19829	2	2	26
13	LHCII type I CAB-36, LHCB1 [Nicotiana tabacum]	84	gi|19827	2	1	8
14	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein, LHCA3 [Arabidopsis thaliana]	155	gi|430947	5	3	14
	ATP szintáz					
4	ATP synthase beta subunit [Anagallis arvensis]	260	gi|12004131	4	4	15
16	ATP synthase delta chain, chloroplast	369	gi|114584/ BQ487814	8	4	20
18	ATP synthase beta chain, chloroplast precursor (Subunit II)	64	gi|461595	1	1	4
	Enzimek					
2	Rubisco Large Subunit	143	gi|118624224	4	3	9
9	33 kDa precursor protein of the OEC [Salicornia europaea]	363	gi|197691939	17	5	21
20	Thylakoid membrane phosphoprotein 14 kDa, chloroplast precursor, putative [Ricinus communis]	59	gi|255541776/F G345112	2	1	4.6
6	fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	240	gi|255581400	17	5	16
7	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic	300	gi|119905	9	5	15
8	fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	278	gi|255581400	44	6	19

Míg a kontroll és Cd-kezelt tilakoidok második dimenziós elválása minőségileg nem különbözött, addig a vashiányos növényekből tisztított tilakoid membránokban (9. ábra, jobb oldala) tisztán kimutatható volt hat olyan fehérje folt, amelyek nem vagy alig jelentek meg a kontroll és a Cd-kezelt növények mintáiban. Ezeket egyrészt a Rubisco kis- és nagy alegységeiként (RbcL, RbcS) azonosítottuk, másrészt 3 egymáshoz közeli foltot alkotó enzimfehérje komplexként (6-8), amely aldolázt és ferredoxin-$NADP^+$ reduktázt (FNR) tartalmazott. Első dimenzióban nagyon gyenge vagy nem festődő sávokat adtak.

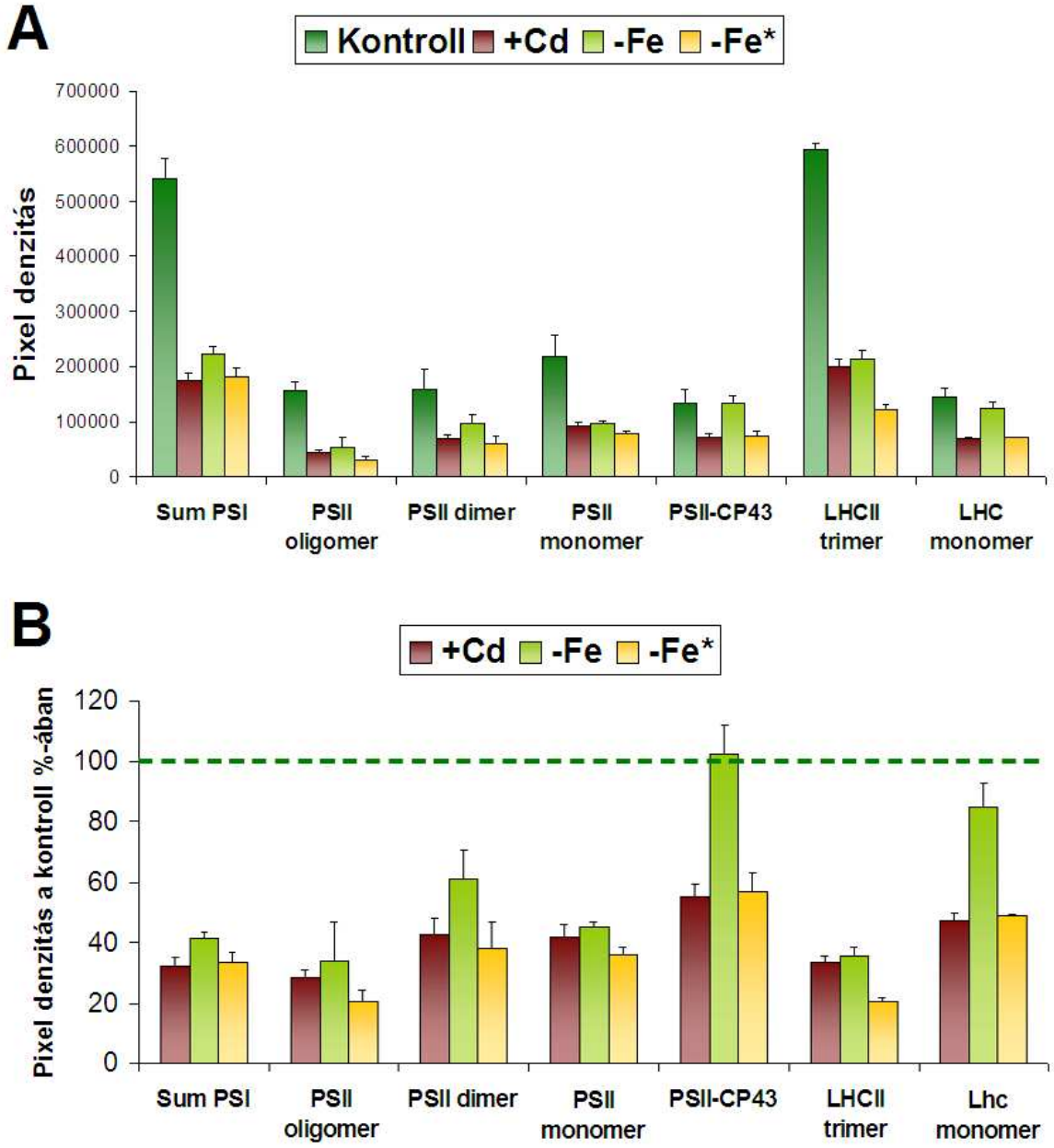
1.3. A pigment-protein komplexek mennyiségének és arányának Cd-kezelés, ill. vashiány által előidézett változásai

A BN-PAGE módszerrel elválasztott Chl-protein komplexeket tartalmazó sávok összpixeldenzitás értéke arányos volt a gélre felvitt tilakoidmembrán mennyiségével, amit a Chl-tartalommal jellemeztünk (204585±15216 pixel ≈1 μg Chl.). A kezelések összehasonlításakor az összpixeldenzitás értékeket a levelek Chl tartalmával arányosítva kimutatható volt, hogy a Chl-protein komplexek eltérő mennyiségben voltak jelen a különbözőképpen kezelt tilakoidokban (10.A ábra). A PSI szuperkomplex és *core* sávok nem minden technikai ismétlésben voltak külön detektálhatóak, ezért a PSI sávok értékeit összevonva ábrázoltuk (sum PSI).

Cd-kezelés hatására minden komplex mennyisége lényegesen és szignifikánsan ($p>0.05$) lecsökkent. Legerősebb hatást a PSII szuperkomplexek, a PSI, és az LHCII trimer esetében mutattunk ki, melyek értéke a kontroll 30%-ára csökkent (10.B ábra). A PSII dimer és monomer, valamint az Lhc monomerek mennyisége a kontrollhoz képest 60%-al csökkent, a CP43-at nem tartalmazó PSII monomer mennyisége pedig csak 50% volt.

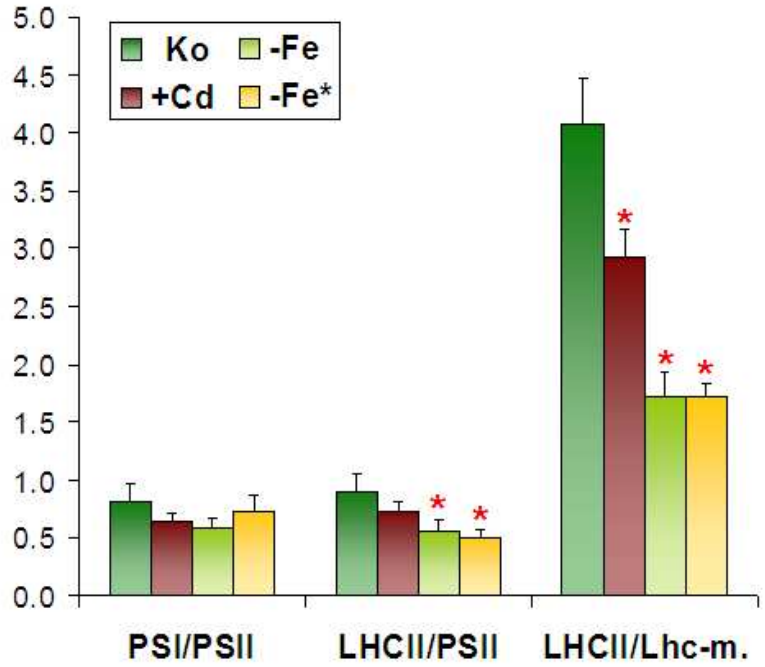
A vashiányos mintákban erősen és szignifikánsan csökkent a PSI, a PSII szuperkomplex és monomer, valamint az LHCII trimer mennyisége, ugyanakkor a PSII dimer mennyisége kevésbé, bár szintén szignifikánsan redukálódott (10.B ábra). Az Lhc monomerek és a CP43 nélküli PSII mennyisége nem különbözött szignifikánsan a kontrollétól.

Az extrém vashiány tüneteit mutató növények (-Fe*) tilakoidjaiban szintén minden komplex mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volta kontrollnál (10.B ábra). A Cd kezeléshez hasonlóan a PSII szuperkomplexek, a PSI és az LHCII trimer mennyisége csökkent legnagyobb mértékben. A kontrollhoz viszonyítva mindössze 20-30%-os értékeket kaptunk, míg a többi komplex kissé magasabb arányban, 40-50%-ban volt jelen.



10. ábra: A: a BN-PAGE-el elválasztott komplexek mennyiségi változása, **B:** a komplexek relatív intenzitása a kontroll százalékában. Ko: kontroll, -Cd: Cd-kezelt, –Fe ill. –Fe*: mérsékelten ill. erősen vashiányos minták.

A kezelések nemcsak csökkentették a Chl-protein komplexek mennyiségét, hanem egymáshoz viszonyított arányukat is befolyásolták (11. ábra). A PSI/PSII arány nem változott lényegesen, az LHCII/PSII arányt viszont a vashiány szignifikánsan csökkentette. Az LHCII/Lhc monomer arány a Cd kezelés és különösen a vashiány hatására szignifikánsan csökkent.

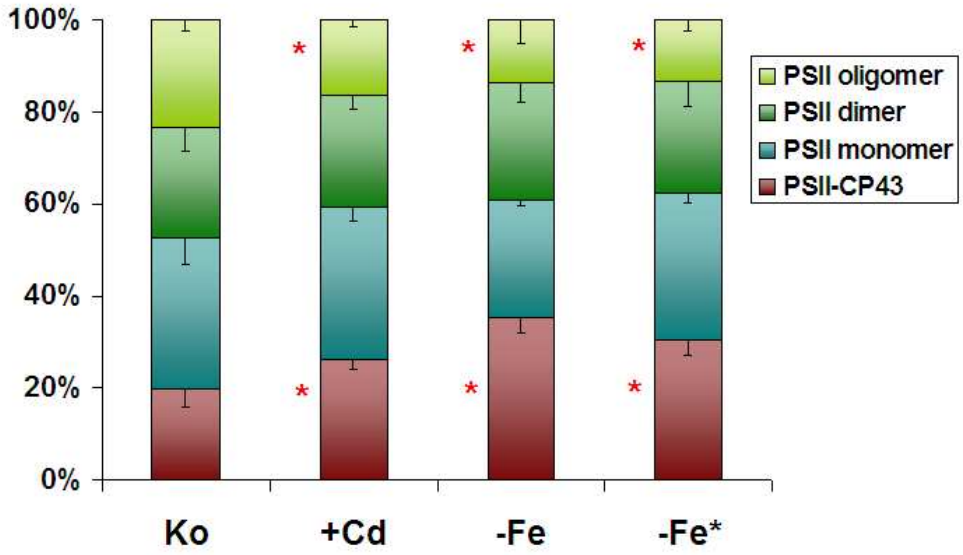


11. ábra: A komplexek egymáshoz viszonyított aránya a kontroll (Ko) és a kezelt tilakoidokban. -Cd: Cd-kezelt, –Fe ill. –Fe*: mérsékelten ill. erősen vashiányos minták.* Szignifikáns eltérés a kontroll értékétől ($p>0.05$).

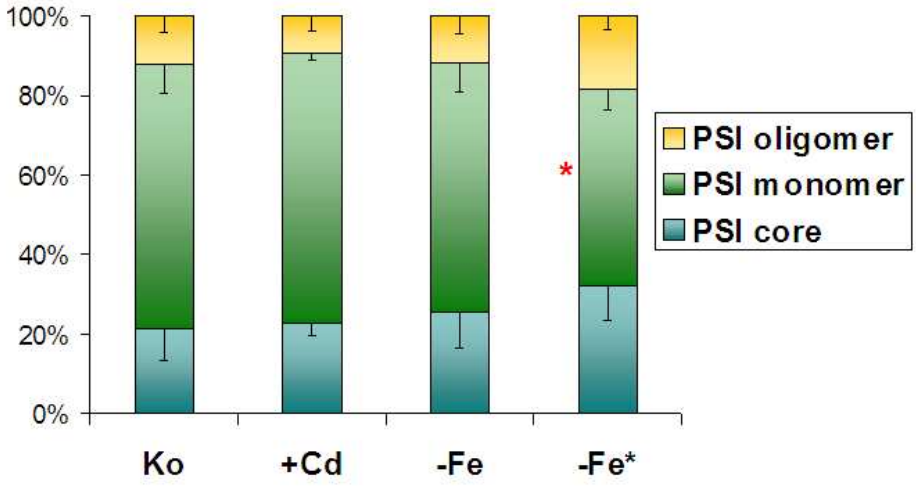
Az egyes komplexek szerveződésében bekövetkezett változásokat mind a BN-PAGE sávok, mind az SDS-PAGE alapján kapott polipeptidek mennyiségi összevetésével értékeltük. A kétdimenziós fehérje gélek kiértékelése során megállapítható volt, hogy a kezelések nem okoztak észrevehető változást az egyes BN sávok polipeptid-összetételében (az adatokat nem mutatjuk).

A PSII komplexeket vizsgálva, a BN-PAGE sávok denzitometriás analízisével, megállapítottuk, hogy a kontroll mintákban a PSII monomer komplex volt jelen legnagyobb mennyiségben (33%), ezzel szemben a szuperkomplexek (oligomerek) és dimer komplexek egyenként 23-24%-ot tettek ki, és 20% CP43 nélküli monomerként jelent meg (12. ábra). Cd hatására változatlan arányt mutattak a dimer és monomer komplexek, ugyanakkor kismértékben csökkent az szuperkomplexek részesedése és egyúttal megemelkedett a CP43 nélküli *core* komplexek aránya. Az enyhén vashiányos növényekben a kontrollhoz képest majdnem dupla arányban volt jelen a CP43 nélküli PSII *core* monomer, ami elsősorban a monomer- és szuperkomplexek arányának csökkenésével járt. Szignifikáns eltérést azonban csak a szuperkomplexek esetében mutattunk ki. Az

erősen vashiányos tilakoidokban a kontrollhoz viszonyítva változatlan arányban voltak jelen a dimer és monomer komplexek, a CP43 hiányos monomerek növekedése, a Cd kezelt mintákhoz hasonlóan, a szuperkomplexek részesedését csökkentette. A denatúráló gélek kiértékelése a PSII és az LHCII esetében megerősítette a natív gélek adatai alapján kapott, a 11. és 12. ábrán bemutatott eredményeket (az adatokat nem mutatjuk).

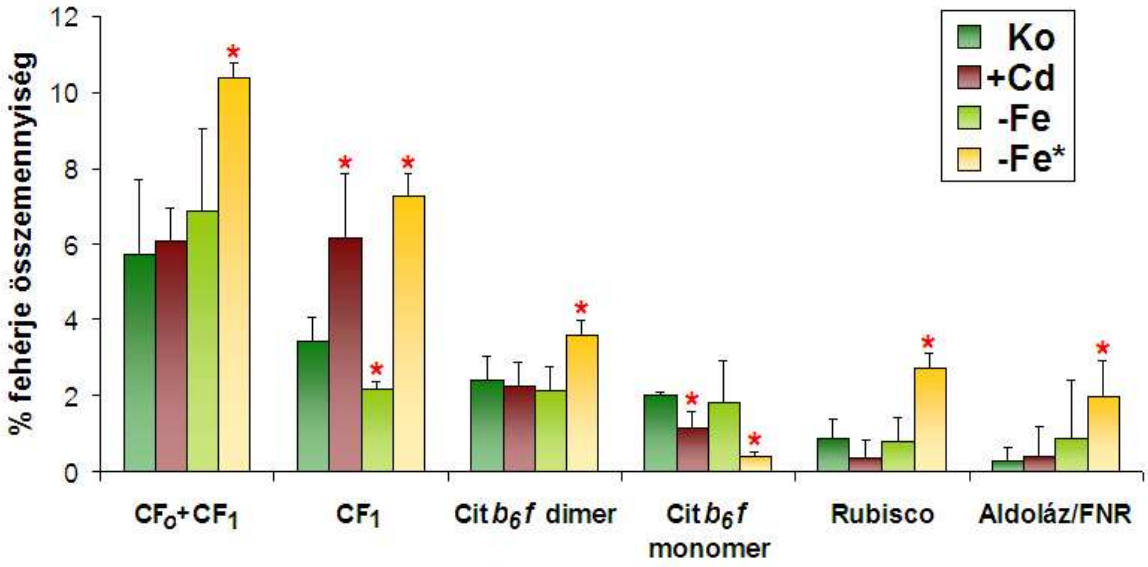


12. ábra: A PSII komplexformák arányai a kontroll (Ko) és a kezelt tilakoidokban. -Cd: Cd-kezelt, –Fe ill. –Fe*: mérsékelten ill. erősen vashiányos minták. * Szignifikáns eltérés a kontroll értékétől (p>0.05).



13. ábra: A PSI komplexformák arányai a kontroll (Ko) és a kezelt tilakoidokban. PSI oligomer: PSI szuperkomplex. Ko: kontroll, -Cd: Cd-kezelt, –Fe ill. –Fe*: mérsékelten ill. erősen vashiányos minták. * Szignifikáns eltérés a kontroll értékétől (p>0.05).

A különböző PSI komplexek arányáról csak a 2. dimenzió adatai szolgáltattak megfelelő információt (13. ábra). Cd hatására mindegyik PSI komplexforma mennyisége közel harmadára csökkent, viszont egymáshoz viszonyított arányaikban nem kaptunk szignifikáns eltérést. A vashiányos mintákban is erősen csökkent a PSI komplexeinek előfordulása, a kontrollban mért értéknek mindösszesen a felét tették ki. Ugyanakkor csak az extrém mértékben vashiányos tilakoidokban mutattunk ki szignifikáns csökkenést a PSI monomerek arányában, amit a szuperkomplexek és *core* komplexek arányos növekedése kísért.



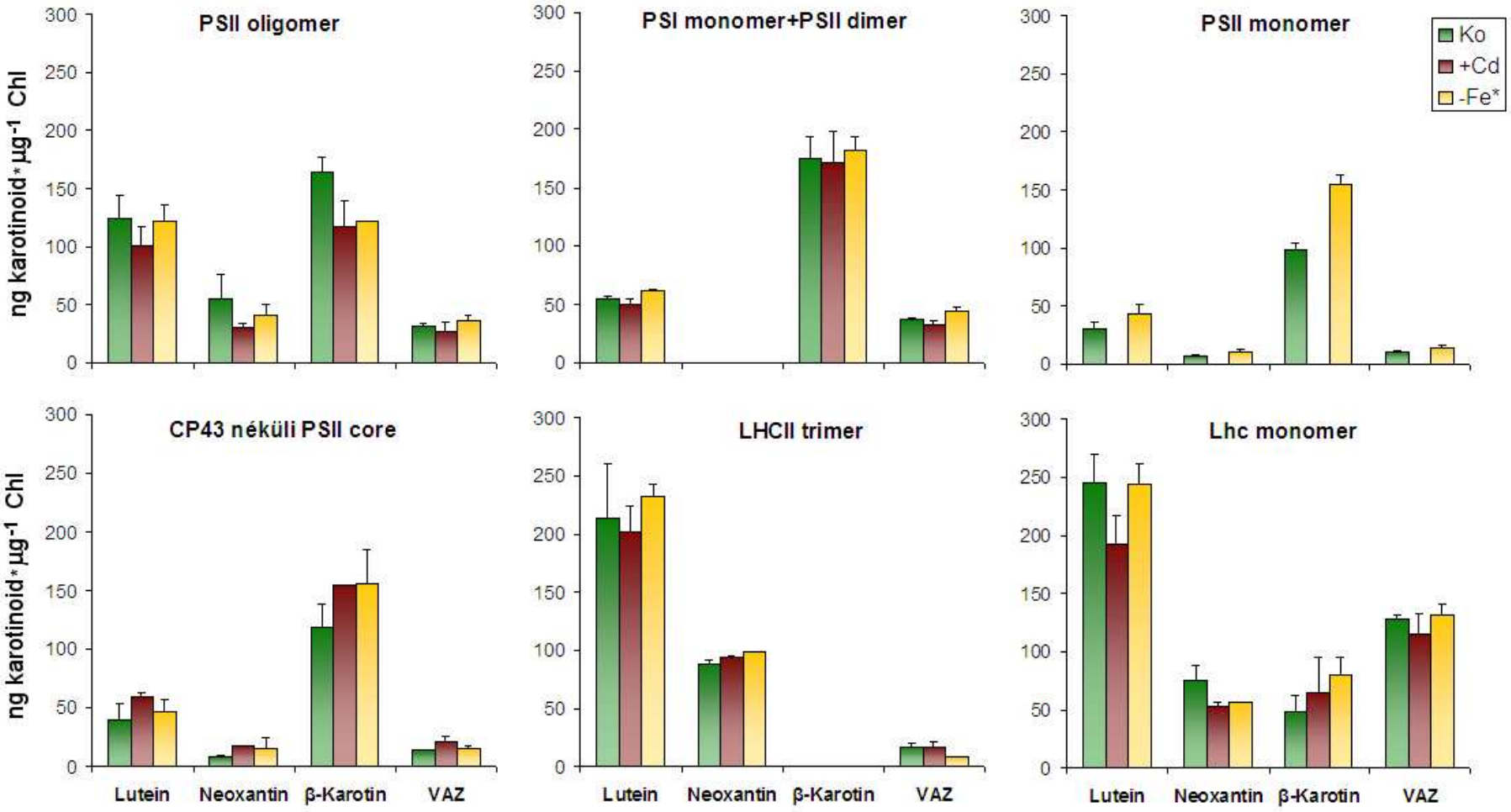
14. ábra A nem pigment-protein komponensek relatív mennyisége a kontroll (Ko) és a kezelt tilakoidokban. -Cd: Cd-kezelt, –Fe ill. –Fe*: mérsékelten ill. erősen vashiányos minták. * Szignifikáns eltérés a kontroll értékétől p>0.05.

Szintén a 2. dimenziós gélek kiértékelése segített felderíteni a tilakoidokban található vagy azokhoz kötődő egyéb, nem pigmentkötő komplexek mennyiségének változását (14. ábra). Az ATP-szintáz mennyisége a kezelések hatására emelkedő tendenciát mutatott, szignifikáns emelkedést azonban csak az extrém vashiányos tilakoidokban kaptunk. Az ATP-szintáz összetevőinek aránya (CF_1/CF_o+CF_1) a Cd kezelés és az erős vashiány hatására a kontrollhoz képest növekedett, míg enyhe vashiányos kezelés hatására némileg csökkent. A Cit b_6/f komplex összmennyisége a kezelések következtében lényegesen nem változott. Kimutattuk azonban, hogy Cd hatására a dimer/monomer arány megemelkedett. Hasonló változást tapasztaltunk az extrém vashiány

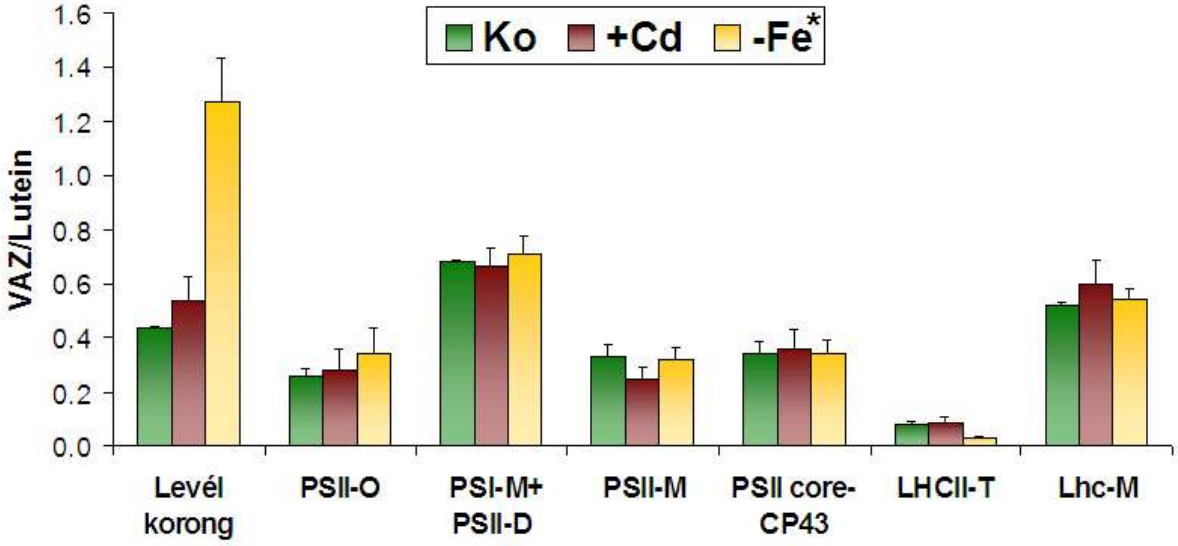
esetén, míg az enyhe vashiány nem okozott változást a kontrollhoz képest. A tilakoidokhoz kötődő Rubisco, valamint az aldoláz és FNR enzimek alkotta komplexek mennyisége az csak az extrém vashiány következtében emelkedett meg jelentősen és szignifikánsan.

1.4. BN sávok karotinoid-összetételének változása a kezelések hatására

Kísérletet tettünk a főbb BN sávok karotinoid tartalmának meghatározására is. A nagy mennyiségű, BN-PAGE-sel előállított mintát igénylő, hosszadalmas kivonási metódus csak kis ismétlésszámot engedett meg. A karotinoidok mennyisége csak a pigment-proteinekre jellemző eltéréseket mutatta. A *core* komplexek főleg β-karotint, ugyanakkor az Lhc-k főleg luteint tartalmaztak (15. ábra). Egyik kezelés hatására sem mutattunk ki szignifikáns eltérést az egyes komplexek karotinoid összetételében. Bár a vashiányos levelekben erősen felhalmozódott a violaxantin-anteraxantin-zeaxantin (VAZ) mennyisége, viszont egyik általunk vizsgált komplexben sem tudtuk kimutatni ezt a felesleget (16. ábra). A lutein tartalomhoz viszonyítva (az Lhc-k mennyiségét reprezentálja az adott komplexben – ld. 1. táblázat) a VAZ pigmentek legnagyobb arányban a PSII szuperkomplex (oligomer), PSI monomer és az Lhc monomer sávokban voltak jelen (16. ábra). Az LHCII trimerekben csak minimális mennyiség volt kimutatható.



15. ábra A BN PAGE-sel elválasztott sávok karotinoid-tartalma. VAZ: violaxantin-anteraxantin-zeaxantin, Ko: kontroll, -Cd: Cd-kezelt,–Fe*: erősen vashiányos minták.

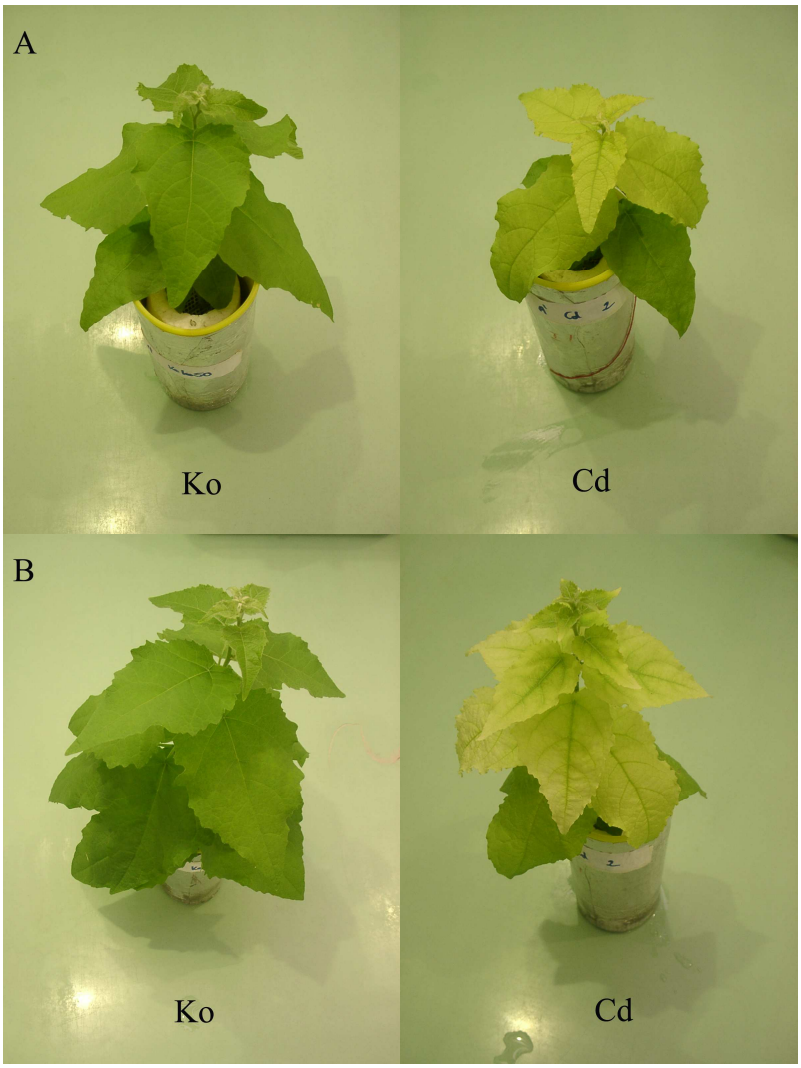


16. ábra A VAZ pigmentek lutein tartalomhoz viszonyított mennyisége a komplexekben -O: szuperkomplex (oligomer); -M: monomer; -D: dimer; -T: trimer, Ko: kontroll, -Cd: Cd-kezelt, –Fe*: erősen vashiányos minták.

2. Az akut és krónikus Cd-stressz hatása a nyárfanövények fotoszintetikus apparátusára

2.1. A növények általános jellemzése

A nyárfa növényeket négyleveles állapotukban kezdtük el kadmiummal kezelni (+Cd). Az első csoportból a 10. napon vettünk mintát (**Cd10**), ekkor jól láthatóak voltak a kezelés tünetei, a növekedésgátlás és a klorózis (17. ábra). A hosszabb távú, 21 napos kezelés után (**Cd21**) a növények bizonyos fokú helyreállást mutattak, a már kifejlett levelek az erek mentén visszazöldültek, illetve az új levelek zöldülését tapasztaltuk.



17. ábra. Kontroll (Ko) és Cd-kezelt (Cd, 10 µM) nyárfa növények 10 napos (A), illetve 21 napos (B) kezelés után.

A kontroll növények alsó, a kezelés kezdetekor már kifejlett levelei (-2) a kezelés során árnyéklevéllé módosultak, illetve öregedtek, ami a száraz tömegre vonatkoztatott elemkoncentrációkban némi változást okozott. Elsősorban a K-, Mg-, a Mn-tartalom csökkent, a Zn-tartalom pedig emelkedett a fiatal levelekéhez képest (6. táblázat). A kontroll levelekben csak elhanyagolható mennyiségű Cd volt kimutatható. A kezelt növényekben a Cd folyamatos felhalmozódása volt jellemző a kezelés teljes ideje alatt. A Cd10-es alsó levelekben a Cd felhalmozódásán kívül nem volt szignifikáns változás az elemkoncentrációkban a kontrollhoz képest. Cd-koncentrációjuk a felső levelekétől nagyságrendileg nem különbözött. A Cd10-es felső levelek vaskoncentrációja már a rövid idejű kezelés alatt nagymértékben lecsökkent. A Cd21-es növény +2-es leveleiben ugyan kissé emelkedett a vas mennyisége, de ez nem jelentkezett a %-os arány növekedésében mivel a kontrollban is nőtt a vaskoncentráció. A K-, Ca-, és a Mn-koncentráció Cd-kezelés hatására mérsékelten változott, a Zn koncentrációja viszont emelkedett, különösen a Cd21-es növény felső leveleiben.

6. táblázat: A 10 és 21 napig Cd-mal kezelt és a megfelelő kontroll növények elemtartalma a levél száraz tömegére vonatkoztatva.

	10 napos kezelés				**21 napos kezelés**	
	alsó levél (-2)		**felső levél (+2)**		**felső levél (+2)**	
	Ko ($\mu g\ g^{-1}$)	**+Cd (Ko%)**	**Ko** ($\mu g\ g^{-1}$)	**+Cd (Ko%)**	**Ko** ($\mu g\ g^{-1}$)	**+Cd (Ko%)**
Cd	0,34 *0,11*	**203,3*** ($\mu g\ g^{-1}$) ***22,4***	1,16 *0,20*	**268,0*** ($\mu g\ g^{-1}$) ***17,3***	2,29 *0,90*	**373,0*** ($\mu g\ g^{-1}$) ***28,2***
K	23019 *2980*	96,2 *15,0*	39228 *5361*	**77,5*** ***4,1***	41679 *3461*	89,8 *1,5*
Ca	7157 *1742*	91,0 *8,2*	7650 *155*	**68,2*** ***9,3***	9683 *154*	**85,2*** ***1,6***
Mg	1285 *244*	90,2 *3,1*	1912 *197*	**114,1*** ***6,4***	1974 *88*	**119,9*** ***4,1***
Fe	107,3 *27,5*	90,3 *16,3*	96,9 *7,7*	**27,8*** ***1,7***	149,0 *11,4*	**32,1*** ***4,9***
Mn	50,9 *11,6*	91,7 *12,2*	70,7 *11,9*	**69,2*** ***5,4***	90,3 *6,6*	90,4 *2,2*
Zn	82,1 *10,0*	119,6 *19,57*	31,4 *4,3*	**117,9*** ***7,5***	49,2 *2,8*	**142,3*** ***1,9***

* Szignifikáns eltérés a kontroll értéktől ($p>0,05$).

A rövidtávú kezelés alatt az egy levélre jutó elemtartalom (mg elem/levél) a legtöbb elem esetében kb. 30%-kal csökkent a kontrollhoz képest (az adatokat nem mutatjuk), a vastartalmuk viszont csak 15%-a volt a kontrollénak. A hosszú távú kezelés után is hasonló

arányokat kaptunk, kivéve a Zn-et, melynek egy levélre jutó mennyisége 20%-kal növekedett.

A Cd-kezelés a fotoszintetikus apparátus fejlettségét általánosan jellemző Chl mennyiségben és összetételben is jelentős változásokat okozott. A 10 napos Cd-kezelés után kismértékű, de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a -2-es levelek Chl-tartalmában, ugyanakkor a +2-es levelek Chl-tartalma nagyjából a fele volt a megfelelő kontroll levelekének (7. Táblázat). A Chl *a*/*b* arány jelentősen lecsökkent a Cd10-es növények alsó és felső leveleiben is. A 21 napos felső, kontroll levelekben jelentősen megnőtt a Chl tartalom a 10. naphoz képest, azonban a Chl *a/b* arány némileg csökkent. Bár a kezelt 21 napos felső levelek Chl-tartalmában is tapasztaltunk kismértékű emelkedést a 10 napos állapothoz képest, ugyanakkor a kontrollhoz viszonyított értékük alig haladta meg a 30%-ot. A 21 napos kezelés után a Chl *a/b* arány elérte, sőt meg is haladta az időközben lecsökkent kontroll értéket, megközelítve a felső fiatal kontrollra jellemző arányt.

7. táblázat: A 10 és 21 napos kontroll (Ko) és kadmiummal kezelt (+Cd) levelek Chl-tartalma és Chl *a*/*b* aránya.

	10 napos kezelés				**21 napos kezelés**	
	alsó levél (-2)		**felső levél (+2)**		**felső levél (+2)**	
	Ko	**+Cd**	**Ko**	**+Cd**	**Ko**	**+Cd**
Chl *a+b* (µg cm^{-2})	23,00 *1,17*	**17,89*** ***1,65***	19,50 *2,20*	**9,50*** ***1,20***	27,90 *9,60*	**11,00*** ***0,10***
Chl *a*/*b*	3,39 *0,09*	**3,17*** ***0,04***	3,66 *0,14*	**3,27*** ***0,12***	3,41 *0,05*	3,56 *0,09*

* Szignifikáns eltérés a kontroll értéktől ($p>0,05$).

A kezelt növények fotoszintetikus aktivitását jellemző paraméterek is markánsan változtak. A Cd10 növények -2-es leveleiben csak az NPQ értéke csökkent szignifikáns, ugyanakkor a +2-es levelekben a PSII aktuális ($\Delta F/F_m'$) és maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m), valamint az NPQ is erősen lecsökkent a megfelelő kontrollhoz képest (8. táblázat). A kioltás különböző mechanizmusainak megoszlását tekintve, a ΔpH kialakulásával és a xantofill-ciklus működésével kapcsolatos antenna kioltás (Φ_{NPQ}) aránya kissé csökkenő, míg a működésképtelen PSII komplexek általi hődisszipáció (Φ_{NF}) kissé emelkedő tendenciát mutatott az alsó levelekben, de a PSII fotokémiai hatékonysága nem csökkent. A +2-es levelekben szintén kissé csökkent a Φ_{NPQ} aránya, ugyanakkor a fluoreszcencia/konstitutív hődisszipáció ($\Phi_{f,D}$) kismértékben, a Φ_{NF} pedig jelentősen megemelkedett a PSII fotokémiai hatékonyságának (Φ_{PSII}) terhére. A kezelt levelekben a 21. napra a fotoszintetikus aktivitás majdnem teljesen helyreállt. Mind

a PSII aktuális és maximális kvantumhatékonysága, mind az NPQ megközelítette a kontroll értékét. A kioltási mechanizmusok aránya volt hasonló a kontrollhoz, bár a működésképtelen PSII komplexek általi hődisszipáció (Φ_{NF}) értéke kissé magasabb maradt.

8. táblázat. A fotoszintetikus aktivitás és a nem-fotokémiai kioltás változása, valamint a kioltási paraméterek %-os megoszlása a kontroll és Cd-kezelt levelekben.

	10 napos kezelés				21 napos kezelés	
	alsó levél (-2)		felső levél (+2)		felső levél (+2)	
	Ko	+Cd (Ko%)	Ko	+Cd (Ko%)	Ko	+Cd (Ko%)
F_v/F_m	0,782 *0,013*	99,3 *3,0*	0,800 *0,004*	**77,8** ***7,8***	0,790 *0,006*	89,5 *4,3*
$\Delta F/F_m'$	0,641 *0,040*	102,2 *7,9*	0,691 *0,018*	**82,2** ***7,7***	0,695 *0,019*	92,7 *6,9*
NPQ	0,279 *0,115*	**78,6*** ***37,4***	0,214 *0,059*	**55,6** ***14,0***	0,170 *0,069*	93,5 *21,2*
Φ_{PSII} (%)	64,1 *4,8*	65,0 *6,2*	69,6 *0,4*	**43,7*** ***4,9***	68,3 *1,1*	**62,5*** ***3,6***
Φ_{NF} (%)	0,1 *1,7*	**0,8*** ***3,0***	-0,6 *0,9*	**23,0*** ***4,8***	0,0 *1,0*	**3,9*** ***2,8***
Φ_{NPQ} (%)	7,8 *3,1*	**6,2*** ***3,3***	5,1 *1,1*	4,0 *1,1*	4,3 *0,6*	4,3 *1,2*
$\Phi_{f,D}$ (%)	28,1 *1,9*	28,0 *1,4*	25,9 *0,5*	**29,3*** ***0,7***	27,4 *1,1*	29,3 *1,4*

* Szignifikáns eltérés a kontroll értéktől (p>0,05)

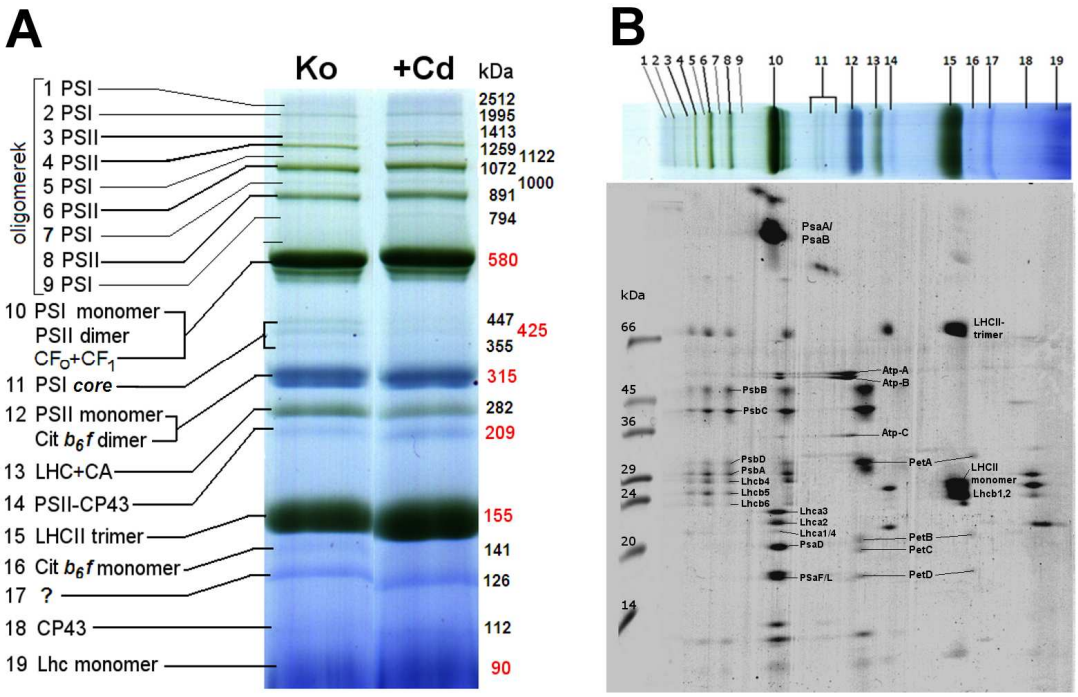
2.2. A pigment-protein-összetétel változásai a tilakoidokban akut és krónikus Cd-stressz esetén

A natív körülmények között BN-PAGE módszerrel elválasztott pigment-protein komplexeket fehérje-összetételük alapján, valamint a hasonló komplexeket tartalmazó sávok apoprotein mintázatát összevetve és a hasonló gélelektroforézis rendszert használó irodalmi adatokra támaszkodva (*Suh és mtsai, 2000; Seelert és mtsai, 2003; Aro és mtsai, 2005; Nelson és Yocum, 2006*) azonosítottuk.

A natív gélen kapott 19 sáv (18. ábra) közül az első 9 sáv PSI és PSII szuperkomplexeket tartalmazott. Az 580 kDa-os (10) sávban monomer PSI, ATP szintáz és dimer PSII volt megtalálható. A 11-es számmal jelölt sávok a PSI LHCI-t nem tartalmazó, un. *core* komplexei. A 315 kDa-os (12) sáv PSII *core* monomert és Cit b_6/f dimer komplexet tartalmazott. A 11. és 12. sáv között megjelentek a CF_1 proteinjei is. Kapcsoló antennát kötő LHCII trimert találtunk a 13. sávban. A CP43 nélküli PSII *core* komplexet a 14. sávban azonosítottuk, a róla levált monomer CP43 pedig a 18. sávban jelenik meg. A

155 kDa-os erőteljes, zöld színű sáv LHCII trimerekből áll. A 16. sávban a Rieske Fe-S protein nélküli Cit b_6/f monomer mutatható ki. A 17. sáv alkotóit nem sikerült azonosítani. Az utolsó, festékfronttól alig elváló, nagy mobilitású sávot Lhc monomerek alkotják.

18. ábra: **A:** a 10 napos kontroll (Ko) és Cd-kezelt (+Cd) növények tilakoidjaiból BN



PAGE-sel elválasztott sávok azonosítása. A komplexek ismeretlen molekulatömegét (fekete számok, kDa) a *Fagioni és mtsai. (2009)* által leírt sávok molekulatömegét standard-ként használva (piros számok) becsültük meg. **B:** A kontroll tilakoidokból BN-PAGE-sel elválasztott sávok (fent) második dimenzióban denaturáló SDS-PAGE-sel kapott fehérje összetétele (lent). Standard proteinek (kDa): marha szérum albumin (66), ovalbumin (45), nyúl izom gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (36), szénsav anhidráz (29), marha pankreász tripszinogén (24), szója tripszin inhibitor (20.1), marha α-laktalbumin (14.2)

A PSI monomer sáv proteinjei közül a legnagyobb molekulatömegű folt az aggregált PsaA,B proteineket tartalmazta. Alatta jelent meg az ATP-szintáz CF1 részének α, és β alegységeit reprezentáló jellegzetes dupla sáv (AtpA, AtpB), míg a γ alegységet valamivel lejjebb, 35 kDa-nál találtuk (AtpC). A gél alsóbb régiójában, 22-24 kDa között, az LHCI komponensei helyezkednek el egymás alatt, rendre Lhca3, Lhca2, Lhca1,4. Ez utóbbi legnagyobb része azonban az Lhc monomer sávban jelent meg. Alattuk találhatók a PSI *core* proteinek (PsaD, PsaF, PsaL).

A PSII sávokat alkotó fehérjék az szuperkomplexek (PSII oligomer) régióban láthatók jól elkülönülten. Legnagyobb méretű volt közülük a trimer LHCII, ezt követték a CP47 és CP43 apoproteinjei (PsbB, PsbC). A negyedik folt D2 proteint (PsbD), az ötödik a

PsbO-t és a D1 proteint (PsbA) tartalmazott. A kapcsoló antennát (CA) képviselő CP29, CP26 és CP24 apoproteinjei (Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6) a 24-29 kDa-os régióban voltak megtalálhatók. A Chl-t kötő LHCII trimerek (75 kDa) és monomerek (30 kDa) mellett az apoproteinek a 24-27 kDa-os régióban jelentek meg a gélen.

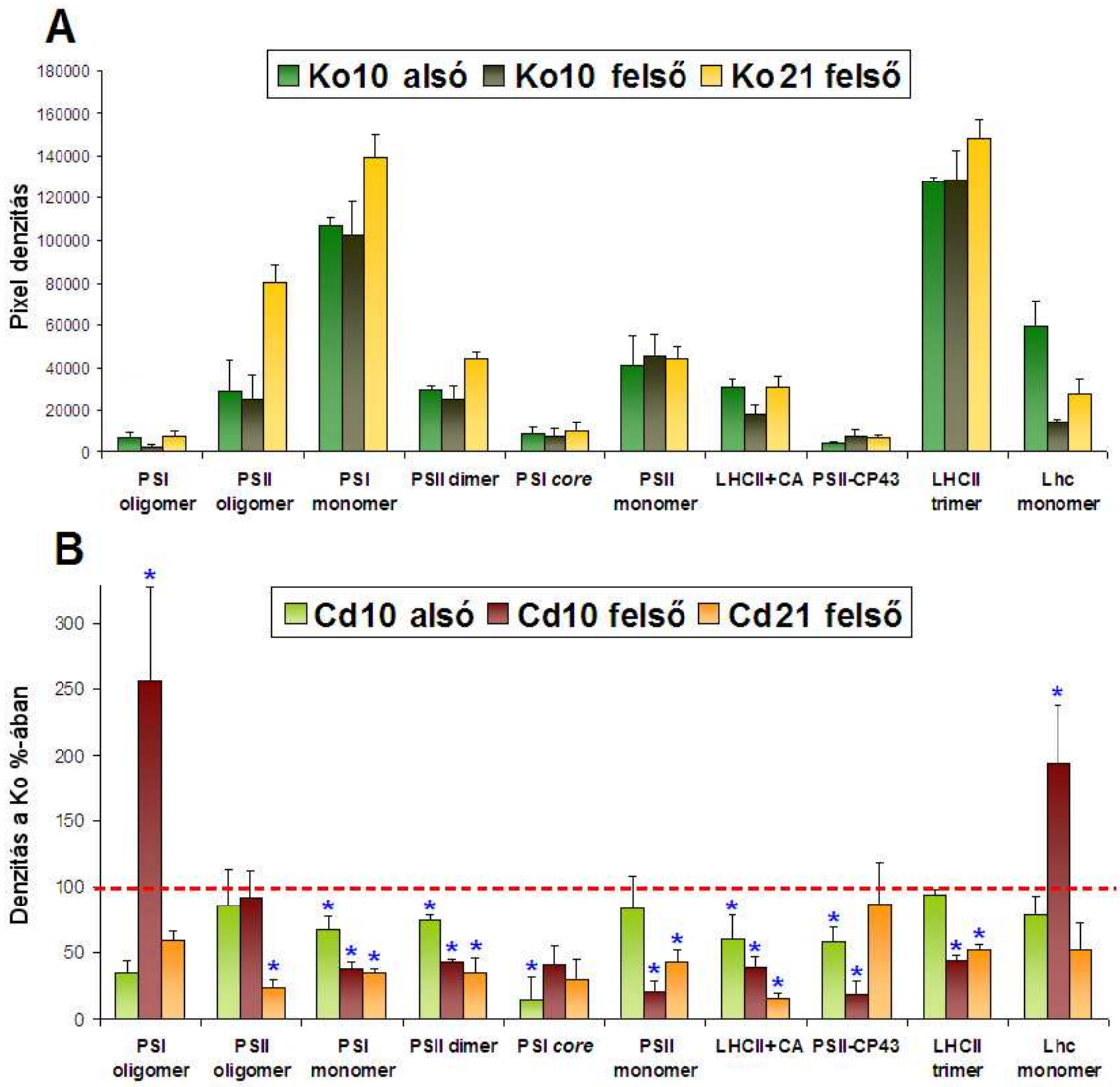
A Cit b_6/f komplex apoproteinjei, a Cit *f* (PetA), a Cit b_6 (PetB), a Rieske Fe-S-protein (PetC) és a IV alegység (PetD), dimer komplexet képezve a PSII monomer sávban vannak jelen. Külön sávot alkotva jelennek meg monomerként az LHCII trimer után, ahol azonban a komplexből a Rieske Fe-S-protein hiányzik.

2.3. A pigment-protein komplexek mennyiségének és arányának változásai akut és krónikus Cd-stressz alatt

A natív gélek denzitometriás analízisének eredménye a 19. ábrán látható. A PSI és PSII szuperkomplexek, valamint a PSI *core* esetében az eltérő molekulatömegű sávokat a kiértékelés során összeadtuk.

A 10. napon, a legtöbb komplex mennyisége azonos volt az alsó és felső kontroll levélmintákban (19.A ábra). Eltérést a PSI szuperkomplexek, az LHCII+CA és az Lhc monomer sáv denzitásában mértünk. A 21 napos kontroll mintákban a komplexek nagy részének mennyisége megemelkedett a 10 napos kontroll levelekéhez képest. A legnagyobb mértékű emelkedést a PSII szuperkomplexek, a PSI, a PSII dimer és az LHCII mennyiségében figyeltünk meg.

A rövid Cd kezelés következtében az alsó levelekben 30-40%-kal csökkent a PSI komplexek, PSII dimer, LHCII+CA és a PSII-CP43 komplexek mennyisége a kontrollhoz képest. A felső levelekben sokkal erőteljesebb változásokat tapasztaltunk. Rövid kezelés hatására a PSI szuperkomplexek és az Lhc monomerek mennyisége jelentősen emelkedett, míg a PSI monomer, PSII dimer, PSII monomer, LHCII+CA és LHCII trimer sávok mennyisége mintegy 60-80%-kal csökkent.



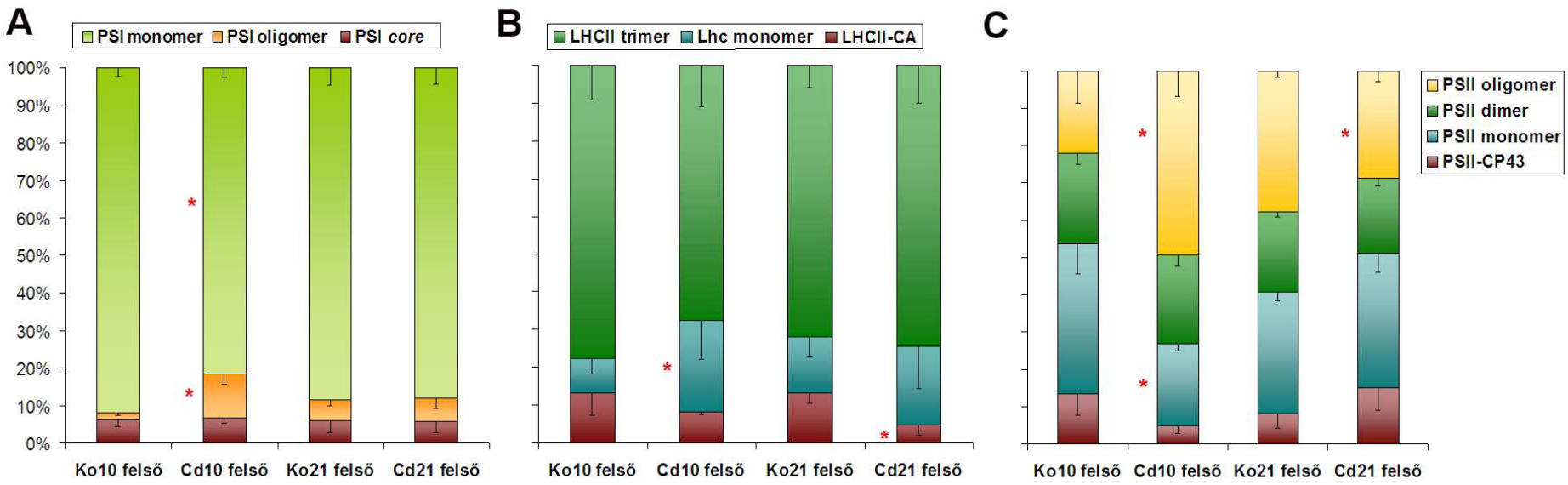
19. ábra A: a kontroll BN sávok intenzitása a levelek Chl-tartalmára vonatkoztatva. **B:** a Cd kezelt BN sávok denzitása a megfelelő kontroll százalékában. Oligomer – szuperkomplex. * Szignifikáns eltérés a kontroll értéktől (p>0,05).

A hosszabb kezelés után is változatlan maradt a PSI monomer, PSII dimer és LHCII trimerek csökkent mennyisége, míg a PSII monomer és a CP43 nélküli PSII mennyisége emelkedett. Bár a PSII szuperkomplexek abszolút mennyisége csak kismértékben tért el egymástól a Cd10-es és Cd21-es mintákban, a Cd21-es mintában a Ko21-hez képest mindössze 23%-nak adódott a kontroll érték nagymértékű emelkedése miatt. Az LHCII+CA komplexek mennyisége a hosszabb távú kezelés folyamán még tovább csökkent.

A Cd kezelés amellett, hogy csökkentette a Chl-protein komplexek mennyiségét, egymáshoz viszonyított arányukat is befolyásolta, legalábbis a felső levelekben. Az alsó levelek esetében nem mutattunk ki ilyen jellegű változásokat. A PSI szuperkomplex/PSI

monomer arány szignifikánsan megemelkedett a Cd10-es mintákban, de kismértékű emelkedés megfigyelhető volt a 21 napos kontroll és a kezelt mintákban is, míg a *core* komplexek mennyisége állandó maradt (20.A ábra). Mind a Cd10, mind a Cd21-es mintáknál az Lhc monomerek aránya növekedett meg a kontrollhoz képest (20.B ábra), ezzel egyidejűleg a Cd10 mintákban csökkent az LHCII trimer és az LHCII+CA aránya, a Cd21 esetében csak az LHCII+CA komplexek mennyisége csökkent. A második dimenziós fehérje gélek denzitometriás kiértékelése megerősítette a PSI és az LHCII esetében a natív gélek adatai alapján kapott eredményeket (az adatokat nem mutatjuk).

A PSII komplexek megoszlását a BN poliakrilamid gélen kapott sávok denzitometrálásával és a második dimenzióban végzett (SDS-PAGE) elválasztás után kapott fehérje foltok kiértékelésével (20.C ábra) is megvizsgáltuk. A 2D fehérje gélelektroforézis után csak a CP47 apoprotein mennyiségét hasonlítottuk össze, mert így pontosabban mérhettük a különböző méretű antennákkal rendelkező, ill. antenna nélküli PSII komplexek arányát. A kapott eredmények megerősítették, ugyanakkor pontosították is a BN-PAGE módszerrel kimutatott eltéréseket (az adatokat nem mutatjuk), mivel a legtöbb esetben csökkent a szórás. A 10 napos kontroll mintában a PSII monomer komplex volt jelen legnagyobb mennyiségben. Az idősebb kontroll növényekben a szuperkomplexek mennyisége kissé emelkedett a PSII monomer és CP43 nélküli komplexek terhére. A PSII dimer mennyisége a különböző mintákban viszonylag állandó volt. A Cd10 kezelés hatására megemelkedett az szuperkomplexek aránya, ugyanakkor jelentősen és szignifikánsan csökkent a monomer formák részesedése. Hosszabb Cd kezelés után azonban visszafordult a tapasztalt arányeltolódás és a kontrollhoz hasonló eloszlást mértünk.



20. ábra A: a PSI tartalmú BN sávok arányainak változása a kezelések hatására a felső levelekben. **B:** az Lhc tartalmú BN sávok arányainak változása a kezelések hatására a felső levelekben. **C:** a PSII komplexformák arányainak változása a felső levelekben a kezelések hatására (2.D SDS gélek kiértékelése alapján).* Szignifikáns eltérés a kontroll értékétől ($p>0.05$).

2.4. Az akut Cd-stressz hatása az antennák izoforma-összetételére

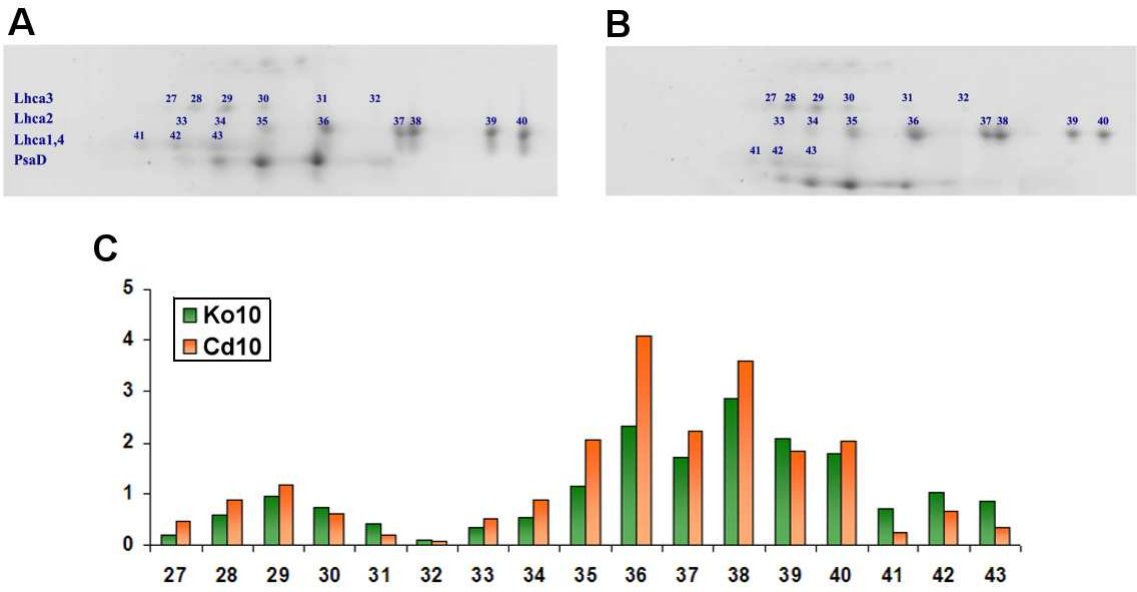
A 2D BN/SDS gélek analízisének eredményei azt mutatták, hogy a Cd kezelés viszonylag rövid idő alatt (10 nap) megváltoztatta a tilakoid membránokban található komplexek mennyiségét és arányait, ezzel a módszerrel azonban összetételükben nem volt kimutatható változás (*Ross, 2010*). Az egyes fehérjék minőségi és mennyiségi változásának felderítésére a 2D IEF/SDS PAGE módszer alkalmasabb. A komplexek *core* részében lokalizált, meglehetősen nagyméretű, apoláros membránfehérjéket nem lehet megfelelően oldatba vinni az IEF-hez használatos detergensekkel, viszont az antennát alkotó, 20-30 kDa-os mérettartományba eső Lhc fehérjék jól vizsgálhatók ezzel a módszerrel. Az Lhc fehérjék eltérő izoformáinak mennyiségi és minőségi változásait a fehérjék szintjén megvizsgálva, az eredmények összevethetőek a transzkripciós szinten megfigyelhető változásokkal. A Cd-indukálta összetételbeli változások kimutatása céljából ezért 2D gélelektroforézisre alkalmas fehérjekivonatot készítettünk a BN-sávokból, majd ezeket IEF/SDS gélrendszerben analizáltuk. Mivel elsősorban az Lhc apoproteinek változásait kívántuk követni, a főbb Lhc-tartalmú sávokat, a PSII szuperkomplexek (18. ábra, 4., 6. és 8. BN sáv), PSI monomer (10.), LHCII-CA (13.), LHC trimer (15.) és Lhc monomer (19.) sávot választottuk ki a munkához. A komplexekből készült 2D gélek Lhc sávjainak helyzetét a tilakoid mintákból készült IEF/SDS gélek segítségével, valamint irodalmi adatok alapján (*Storf és mtsai, 2004; Andalúz és mtsai, 2006; Galetsky és mtsai, 2008*) becsültük meg (21. és 22. ábra). A pontos azonosításhoz további vizsgálatok szükségesek.

A kontroll és Cd-kezelt PSI komplexek antenna összetevőinek mintázata azonos (21. ábra), ezért arra következtettünk, hogy a kezelés az LHCI antenna fehérje összetételét nem változtatta meg. A viszonylag nagy mennyiségben jelenlévő *core*-proteinhez, a PsaD-hez viszonyított arányukban azonban kimutattunk változást. Megemelkedett az Lhca2 mennyisége, ami különösképpen két izoforma (35, 36) esetében volt szembetűnő (21.C ábra). Ugyanakkor csökkent az Lhca1 és Lhca4 fehérjék aránya a Cd kezelt PSI partikulumokban.

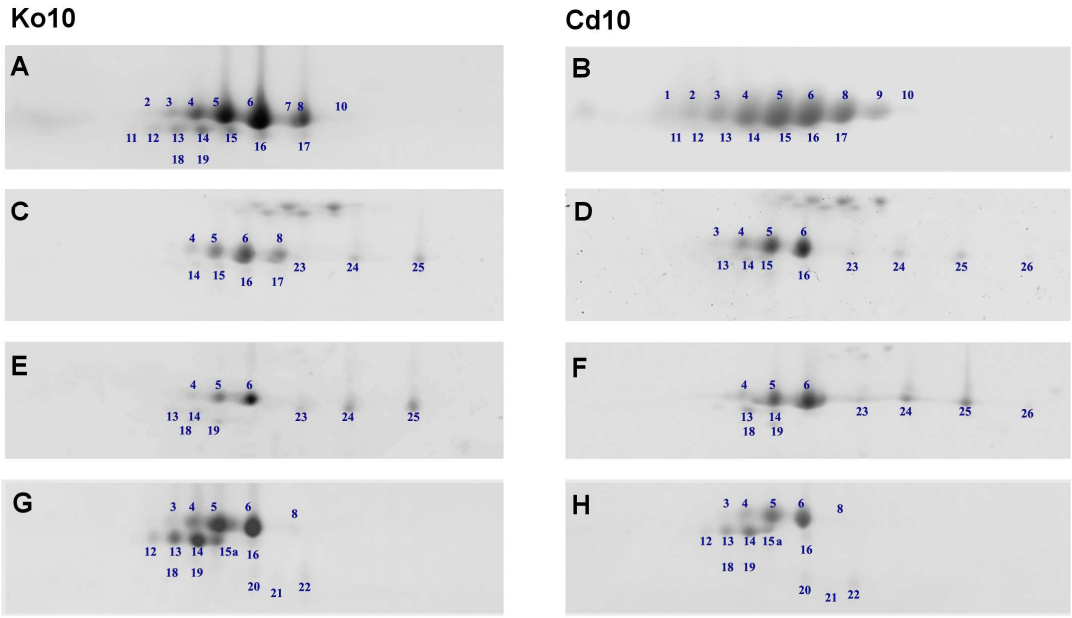
Az Lhcb fehérjék több komplexben is jelen vannak. Az Lhcb1-3 által alkotott LHCII trimer komplexben e fehérjék sokféle izoformája ill. poszt-transzlációs módosulata lehet jelen a különböző izoelektromos ponttal jellemezhető foltok számából következően (22.A és B ábra). A Cd kezelés e formák arányára és előfordulásukra is hatással volt. Az 1-10 foltok az Lhcb1 és Lhcb2, valamint komplextől függően Lhcb4 izoformákat is tartalmazhatnak. A 11-17-es számú foltok valószínűleg az Lhcb3-nak, a 23-26 az Lhcb5-nek (CP26), a 20-22-es

számú foltok pedig az Lhcb6-nak (CP24) felelhetnek meg. Viszonyítási alapnak egy minden komplexben közepes mennyiségben jelenlévő Lhcb1,2 izoformát (5) választottunk.

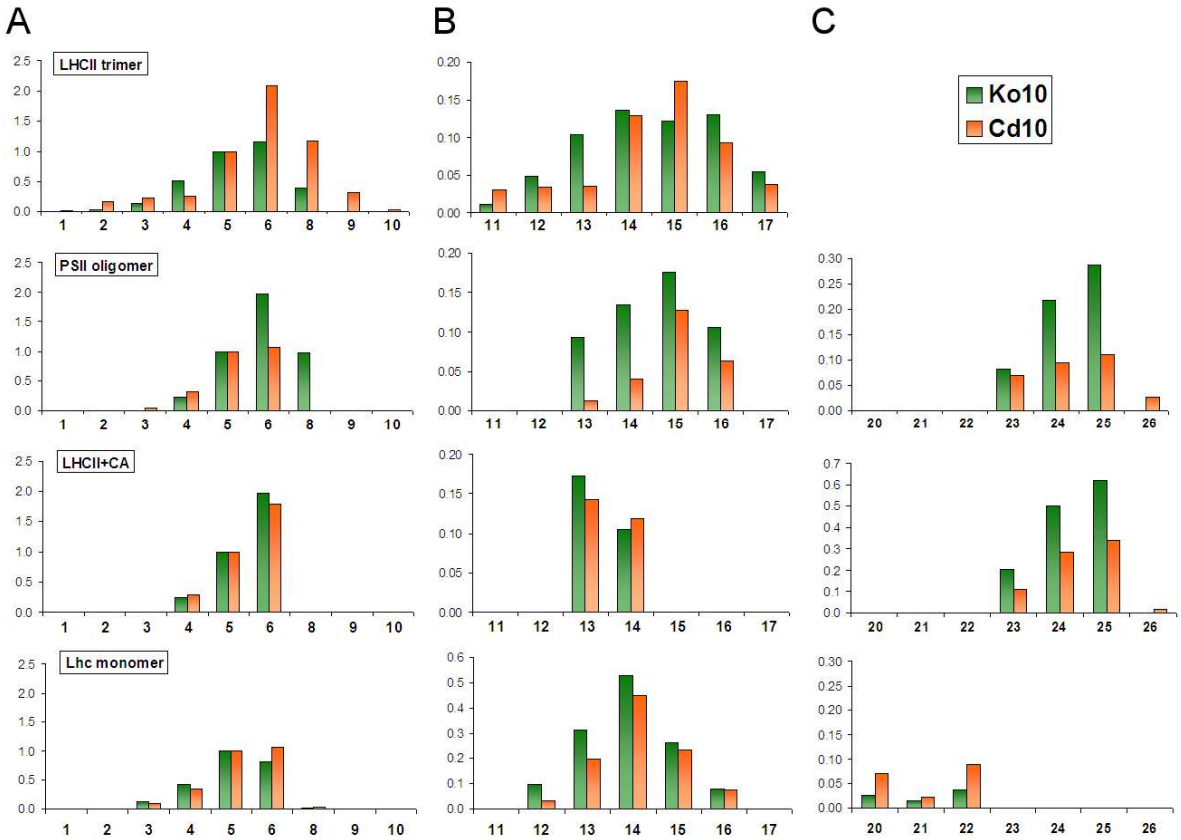
Cd kezelés hatására a legnagyobb változásokat a trimer LHCII-ben és a PSII szuperkomplexekben figyeltük meg (22/A-D ábrák). Az LHCII trimerben erősen megemelkedett a 6-os és 8-as foltokban lévő fehérje mennyisége, és megjelent a kontrollban nem észlelhető 9-es számú új izoforma (23.A ábra). Az LHCII trimert, és kapcsoló antennát is tartalmazó PSII szuperkomplexek összetételében a legszembetűnőbb a 6-os erős csökkenése és a 8-as eltűnése volt (23.B ábra). Ugyanakkor a kisebb mennyiségben jelenlévő feltehetően Lhcb3 izomereket képviselő 13-as és 14-es folt intenzitása is jelentősen lecsökkent. A kezelés következtében mind a PSII szuperkomplexben, mind az LHCII+CA komplexben kissé csökkent az Lhcb6-nak megfelelő 23-25-os proteinek mennyisége, és megjelent egy újabb izoforma, amit a 26-os számmal jelöltünk (23/B,C ábrák). Az Lhc monomerben az LHCII-höz hasonlóan megnőtt a 6-os protein mennyisége, és valamivel több Lhcb6 (20-22) volt kimutatható (23.D ábra). Az antenna összetétel vizsgálata során kapott előzetes eredményeink azonban további megerősítést igényelnek. A következtetések levonása pedig a foltok pontos azonosítása után válik lehetségessé.



21. ábra Az Lhca fehérjék a 10 napos kontroll (Ko10: **A**) és a Cd-kezelt (Cd10: **B**) PSI komplexekben. IEF pH tartomány: 4 → 7. **C:** Az egyes proteinek mennyiségét relatív egységben, a PsaD fehérje összmennyiségéhez képest adtuk meg.



22. ábra: Az Lhcb fehérjék a kontroll (Ko10: A, C, E, G) és Cd kezelt (Cd10: B, D, F, H) tilakoid komplexekben. A, B: LHCII trimer; C,D: PSII oligomer; E,F: LHCII+CA; G,H: Lhc monomerek; IEF pH tartomány: 4 → 5,5.



23. ábra: Az Lhcb fehérjék mennyiségének változása a tilakoid komplexekben Cd kezelés hatására. **A:** Lhcb1-2 izoformák, **B:** Lhcb3; **C:** Lhcb5-6. Az egyes proteinek mennyiségét relatív egységben, az 5. számú folthoz képest adtuk meg, különböző skálán ábrázolva. A számozás a 22. ábra fehérjefoltjainak felel meg.

3. Az *Lhc* géncsalád transzkripciós szintjének változása nyárfalevelekben akut Cd-stressz alatt

Az mRNS izoláláshoz mind a kezelt, mind a kontroll csoport esetében 3-3 növény azonos levélemeletéről származó, és azonos korú levelét használtuk fel. Eltérő számozás különbözteti meg a kezelés kezdetén már kifejlett, alsó (-2) és a kezelés alatt fejlődő, felső (+2) leveleket. Az alsó (-2) levelek esetében a kezelés kezdetétől számított 2. és 7. napon vettünk mintát mind a kontroll, mind a Cd-kezelt növényekből. A kezelés megkezdését követően fejlődött, felső (+2) levelekből három időpontban vettünk mintát, a kezelés kezdetétől eltelt 4., 7. és 14. napon.

3.1. A cDNS mennyiségi meghatározása

Az átlagosan 130-150 mg levélmintából mRNS-et izoláltunk. Az mRNS mintákból reverz transzkripcióval kapott egyszálú DNS (cDNS) koncentrációját ezután RiboGreen fluoreszcens festék segítségével határoztuk meg. A kapott fluoreszcencia értékekből számoltunk egy ún. normalizációs faktort, melyet a későbbiekben a Real-Time PCR (qPCR) reakciók adatainak korrigálására használtuk (9. táblázat). Erre azért volt szükség, mert a korábban megvizsgált belső kontroll gének expressziója nem bizonyult elég stabilnak a normalizáláshoz (*Basa és mtsai, 2009*). A tíz vizsgált cDNS-mintán a valós idejű amplifikációt korábban optimalizált reakciókörülmények között végeztük (10. táblázat). Az mRNS-ek kiindulási mennyiségét (N_0) a detektált küszöb ciklusszám (Ct) és a reakció hatékonyságának hatványából számoltuk, majd a RiboGreen módszerrel kapott normalizációs faktorral korrigáltuk. A számolás eredményeként megkaptuk az egyes gének mRNS-einek relatív mennyiségét a mintában jelenlévő összes mRNS/cDNS mennyiségéhez viszonyítva.

9. táblázat: A RiboGreen mérés integrált fluoreszcenciája (gerjesztés: λ= 485±5 nm, emisszió: λ= 510-700 nm, cps – counts per second) és a származtatott normalizációs faktor.

Levél-minták	Mintavétel ideje	Kezelés	RiboGreen fluoreszcencia	Norm. faktor
Alsó (-2)	2. nap	Kontroll	5,09E+07 *1,04E+06*	1,00 *0,02*
		Cd-kezelt	3,55E+07 *1,71E+06*	0,70 *0,03*
Alsó (-2)	7. nap	Kontroll	4,48E+07 *1,04E+06*	0,88 *0,02*
		Cd-kezelt	4,11E+07 *9,68E+05*	0,81 *0,02*
Felső (+2)	4. nap	Kontroll	7,68E+07 *5,51E+06*	1,51 *0,11*
		Cd-kezelt	5,49E+07 *4,97E+05*	1,08 *0,01*
Felső (+2)	7. nap	Kontroll	8,03E+07 *1,80E+06*	1,58 *0,04*
		Cd-kezelt	6,31E+07 *3,94E+06*	1,24 *0,08*
Felső (+2)	14. nap	Kontroll	3,34E+07 *9,03E+05*	0,66 *0,02*
		Cd-kezelt	5,18E+07 *2,97E+06*	1,02 *0,06*

A nyárfa genomban az egyes Lhc fehérjék közül többet nem egyetlen gén kódol. Az Lhca1, Lhca2, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4 és Lhcb6 izoformáit két-két gén kódolja, ugyanakkor az Lhcb1 fehérje esetében 4 eltérő izoformát kódoló allélt azonosítottak (*Klimmek és mtsai, 2006*). Az evolúciósan konzervált *Lhc* géncsalád tagjainak szekvenciája nagymértékben hasonló, különösen az azonos fehérjét kódoló gének esetében. A SybrGreen qRT-PCR módszer alkalmazásához két szekvencia-specifikus oligonukleotid szükséges, melyek a vizsgált gén egy rövid szakaszát fogják közre. A Real-Time PCR reakció során ez a szakasz szaporodik fel, miközben minden egyes ciklusban detektáljuk a hozzá kapcsolódó SybrGreen festék fluoreszcens jelét. A jel nagysága arányos a felszaporodott termék mennyiségével. Mivel az egyes izoformákat kódoló gének szekvenciája rendkívül hasonló, nem volt lehetőségünk minden egyes génre specifikus primereket tervezni. Ezt az akadályt úgy hidaltuk át, hogy az egyes fehérjék két eltérő izoformáját kódoló gének esetében terveztünk egy un. „közös” primerpárt, a két gén homológ régiójának együttes felszaporítására, valamint egy másik primerpárt a homológok közül az egyik génre. A primereket rendszerint a gén 3’ UTR régiójának szekvenicája alapján terveztük (10. táblázat). Az Lhcb1 fehérje esetében a szekvencia különbségek alapján lehetőség volt mind a 4 izoforma génjére külön-külön primerpárt tervezni.

10. táblázat: Az *Lhc* géncsalád tagjainak kimutatására és mennyiségének meghatározására tervezett Real-Time PCR reakciók paraméterei.

Fehérje	Gén	bal/jobb primer (5'-3')	Fragment (bp)	Kapcsolás (°C)	cDNS hígítás	PCR hatékony-ság	Ct értékek
Lhca1	***Lhca1.1+ Lhca1.2***	GAGTTGCCAAGTTCTCCAATG/ CAAGGACCCTCAGAAGTTCG	137	59	800x	1.987	17.8-19.8
	Lhca1.2	TCGTCCCTAGAACGCTTTCG/ CACTGTTGATCATAGAGGCATGG	130	59	800x	1.975	25.5-29.4
Lhca2	***Lhca2.1+ Lhca2.2***	ACCCATGACAGCCAACATAGC/ TGGTTTGACCCACTTGGATG	105	59	800x	1.960	16.4-19.7
	Lhca2.1	GAACACTGGTGAACATGC/ CACTCTATGAGAAATCATAACG	125	60	800x	1.975	16.9-20.0
Lhca3	***Lhca3***	GGATTTGGGAAAGACGAGAAG/ GGTGATCCAGGAGGTTTTG	145	59	100x	1.950	14.0-17.2
Lhca4	***Lhca4***	GCTACTGCCAGAAGTTTTCAC/ ATGAACTCGATCACAAAGAGG	114	57	100x	1.945	14.0-18.0
Lhca5	***Lhca5.1***	CTGGCTAGAGATATGGAAAACG/ GTTAGAGAGGTGCTCTATAAGG	150	59	100x	1.909	16.7-21.2
Lhca6	***Lhca6***	GTCACCGGAACCTGTAATGG/ CCAGGATCTGCAATGTGAGC	147	57	100x	1.922	16.1-18.8
Lhcb1	***Lhcb1.1***	AAAGGGACCACTGGAGAAC/ CAATAGTCCCAGCACAG	129	60	800x	1.970	14.2-17.8
	Lhcb1.2	AAAGGGACCACTGGAGAAC/ CACTCAAATCACACACACAC	146	60	3200x	1.945	15.9-18.6
	Lhcb1.3	GGAAAGTGAGCTAACAAAG/ ACGTACCATACAGATTATGC	126	60	3200x	1.921	17.5-22.0
	Lhcb1.4	ACCATCTTGCTGACCCTGTG/ CAAACGACAAGTATCAGTTGCCT	122	60	800x	1.988	16.3-23.3
Lhcb2	***Lhcb2.1+ Lhcb2.2***	GTTGTGCTYATGGGATTCG/ TCCTTCACCTTCAACTCTGC	146	60	3200x	1.991	16.7-20.5
	Lhcb2.2	GAAAGGGTCCTGTTGAGAAC/ CTACAAGGCAACCATCTGAG	120	59	800x	1.985	16.3-19.5
Lhcb3	***Lhcb 3.1+ Lhcb3.2***	AAGGTGGCTTGGACTACTTG/ GTCATTACCCTCTCCTACTCC	143	59	3200x	1.952	20.0-24.4
Lhcb4 (CP29)	***Lhcb4.1+ Lhcb4.2***	ACCCAGAAAAGAAGGCTACC/ GAGGATCGCTCAAGTGAGTAG	144	57	800x	1.951	15.5-19.0
	Lhcb4.1	TCTCCACACGACCATTATTGAC/ TGTGCTTAAATTGCCGAAGG	140	58	3200x	1.988	21.0-23.9
Lhcb5 (CP26)	***Lhcb5***	TGCACTCCTGAAGGTGAAGG/ TTGCCAAAAGGATCGCTGAG	138	62	800x	1.972	13.5-16.5
Lhcb6 (CP24)	***Lhcb6.1+ Lhcb6.2***	TGGTTCGAGGCTGGTGCTGAC/ CCATTCCACSGATTGGGACTC	144	61	3200x	1.963	18.2-23.1
	Lhcb6.2	AGGCTGGTCAAGGCAAGAC/ CAACAGAGAATTGGAGTTGGC	134	60	800x	1.923	16.0-21.4
Lhcb7	***Lhcb7***	ACCCTGTATCTTTTGAGGAG/ TCTGATATGTGCTCGACAAG	139	59	100x	1.940	19.8-22.4
Lhcb8	***Lhcb8***	ATTAGCTTTGTGGCTACCTTC/ GAAGAAAGGAAAGAACGTGTC	107	60	800x	1.953	19.0-21.3

Az Lhc fehérjéket kódoló géncsalád egyes tagjainak transzkripciós szintje nagyságrendileg különbözik (*Klimmek és mtsai. 2006*). A mérés pontos kivitelezéséhez, az adott gén kifejeződési szintjétől függően, jobban vagy kevésbé hígított cDNS templátot használtunk (10. táblázat), ezért a Real-Time PCR esszéket primerpáronként csoportosítottuk. A reakciók kiértékelése után minden génre kaptunk egy sorozat, mértékegység nélküli un. N_0 értéket, amely a kiindulási mRNS mennyiségével volt arányos a tíz különböző kísérleti mintában. Az egyes mérések összehasonlíthatósága végett további korrekciókat kellett végeznünk. Mivel a Real-Time reakciók adatait relatív mennyiségi meghatározásra használtuk fel, viszonyítási alapot kellet választanunk, ez a 2n Ko-2 cDNS minta volt. Ebben a mintában megmértünk az összes vizsgált *Lhc* gén transzkripcióját egy „fordított esszében", ahol a kontroll cDNS-sel szemben az összes primerpár jelen volt. Az így számolt $N_{0;Ko}$ értékek a gének egymáshoz viszonyított relatív transzkripcióját tükrözik a 2n Ko-2 mintán belül (11. táblázat). Ehhez az $N_{0;Ko}$ értékhez arányítottuk a többi minta N_0 értékét az egyes primerpárokkal végzett esszékben. Majd a bemért cDNS mennyiséggel is korrigáltuk az adatokat, vagyis a RiboGreen mérés által generált korrekciós faktorral elosztottuk az N_0 értékeket. Az így kapott mértékegység nélküli számok az egyes *Lhc* génekről átíródó mRNS-ek egymáshoz viszonyított, relatív mennyiségét képviselik minden általunk vizsgált cDNS mintában. A 12. táblázat vízszintes sorai mutatják az egyes gének transzkripciós szintjének változását a tíz különböző vizsgált mintában. A függőleges sorokat olvasva kapjuk meg a gének egymáshoz viszonyított kifejeződési szintjét az adott mintán belül.

11. táblázat: Az *Lhc* géncsalád tagjainak transzkripciós szintje a 2 napos, alsó kontroll levélben.

Gén	N_0	St. dev.	Relatív érték	CV%
Lhca1.1+1.2	2.10E-03	5.57E-05	157.9	2.65
Lhca1.2	1.40E-04	8.27E-06	10.5	5.89
Lhca2.1+2.2	1.96E-03	6.42E-05	147.4	3.27
Lhca2.1	1.44E-03	4.10E-05	108.0	2.85
Lhca3	8.88E-04	2.14E-05	66.6	2.41
Lhca4	3.18E-04	2.31E-05	23.9	7.27
Lhca5	1.63E-04	2.87E-06	12.2	1.76
Lhca6	2.64E-04	8.66E-06	19.8	3.29
Lhcb1.1	5.30E-03	6.96E-05	398.3	1.31
Lhcb1.2	1.09E-02	1.78E-04	819.7	1.63
Lhcb1.3	1.18E-03	1.98E-04	88.8	16.73
Lhcb1.4	1.82E-03	7.33E-05	136.4	4.04
Lhcb2.1+2.2	5.45E-03	5.03E-05	409.2	0.92
Lhcb2.2	1.47E-03	1.98E-04	110.4	13.47
Lhcb3.1+3.2	1.65E-03	5.46E-05	123.7	3.32
Lhcb4.1+4.2	1.41E-03	3.03E-05	105.8	2.15
Lhcb4.1	3.05E-05	1.26E-06	2.3	4.13
Lhcb5	4.01E-03	1.37E-04	300.7	3.41
Lhcb6.1+6.2	2.21E-03	6.03E-05	166.2	2.72
Lhcb6.2	1.26E-03	3.99E-05	94.5	3.17
Lhcb7	1.33E-05	9.99E-07	1.0	7.50
Lhcb8	2.88E-04	1.30E-05	21.6	4.53

.

12. táblázat: Az *Lhca* és *Lhcb* gének mértékegység nélküli relatív transzkripciója, az *Lhcb1.1* gén értékét 100 egységnek véve a 2n Ko-2-es mintában.

	2 nap;-2			7 nap,-2			4 nap; +2			7 nap; +2			14 nap, +2		
Gén	Ko	Cd	Cd (Ko %)	Ko	Cd	Cd (Ko %)	Ko	Cd	Cd (Ko %)	Ko	Cd	Cd (Ko %)	Ko	Cd	Cd (Ko %)
Lhca1.1+ Lhca1.2	39.63	38.21	**96.4#**	47.03	37.72	**80.2**	39.73	56.36	**141.9**	55.18	15.16	**27.5**	45.45	15.17	**33.4**
	1.16	*2.50*	**6.3**	*1.21*	*3.50*	**7.4**	*3.17*	*2.66*	**6.7**	*2.49*	*1.46*	**2.7**	*1.34*	*1.17*	**2.6**
Lhca1.2	0.90	0.53	**58.2**	0.30	0.19	**62.9**	0.41	0.44	**105.1#**	1.34	0.23	**17.0**	0.24	0.09	**37.6**
	0.04	*0.03*	**2.9**	*0.02*	*0.01*	**4.1**	*0.03*	*0.01*	**2.4**	*0.05*	*0.02*	**1.4**	*0.02*	*0.01*	**2.5**
Lhca2.1+ Lhca2.2	37.00	30.84	**83.3**	30.49	29.84	**97.9#**	32.31	39.48	**122.2**	69.67	18.78	**27.0**	33.09	11.31	**34.2**
	0.77	*1.52*	**4.1**	*1.07*	*2.07*	**6.8**	*2.38*	*0.46*	**1.4**	*1.91*	*1.42*	**2.0**	*1.79*	*1.43*	**4.3**
Lhca2.1	27.11	24.14	**89.0#**	23.07	18.77	**81.3**	20.97	36.44	**173.8**	38.19	13.40	**35.1**	24.25	7.24	**29.8**
	0.91	*1.21*	**4.5**	*0.91*	*0.73*	**3.1**	*1.63*	*0.90*	**4.3**	*1.12*	*0.89*	**2.3**	*0.77*	*0.59*	**2.5**
Lhca3	16.73	13.73	**82.1**	15.99	11.36	**71.0**	14.58	9.10	**62.4**	35.13	8.49	**24.2**	15.79	5.52	**35.0**
	1.72	*1.36*	**8.1**	*1.91*	*1.28*	**8.0**	*1.67*	*0.74*	**5.1**	*1.03*	*0.56*	**1.6**	*0.45*	*0.32*	**2.0**
Lhca4	5.99	7.53	**125.6**	7.66	7.19	**93.8#**	7.89	7.36	**93.3#**	13.54	2.21	**16.3**	9.91	3.38	**34.1**
	0.53	*0.57*	**9.5**	*0.44*	*0.54*	**7.0**	*0.97*	*0.41*	**5.2**	*0.71*	*0.18*	**1.3**	*0.59*	*0.41*	**4.1**
Lhca5	3.07	3.70	**120.4**	2.90	1.56	**54.0**	5.67	3.80	**67.1**	12.22	4.61	**37.8**	1.58	1.83	**116.0**
	0.19	*0.25*	**8.3**	*0.13*	*0.07*	**2.3**	*0.44*	*0.21*	**3.7**	*0.31*	*0.37*	**3.0**	*0.06*	*0.11*	**6.8**
Lhca6	4.97	7.51	**151.2**	2.71	3.43	**126.4**	7.46	5.50	**73.8**	12.70	5.69	**44.8**	3.98	4.81	**120.9**
	0.29	*0.78*	**15.8**	*0.14*	*0.26*	**9.7**	*0.62*	*0.07*	**0.9**	*0.42*	*0.36*	**2.8**	*0.12*	*0.30*	**7.5**
Lhcb1.1	100.00	70.25	**70.3**	76.81	74.33	**96.8#**	101.47	134.98	**133.0**	163.48	43.71	**26.7**	108.94	24.18	**22.2**
	3.03	*3.52*	**3.5**	*2.59*	*3.83*	**5.0**	*8.56*	*5.55*	**5.5**	*4.52*	*3.84*	**2.3**	*3.87*	*1.46*	**1.3**
Lhcb1.2	205.78	199.62	**97.0#**	252.10	177.92	**70.6**	181.04	223.82	**123.6**	452.10	92.50	**20.5**	282.88	41.65	**14.7**
	5.57	*10.40*	**5.1**	*7.87*	*4.21*	**1.7**	*13.20*	*6.45*	**3.6**	*11.64*	*5.86*	**1.3**	*12.45*	*2.41*	**0.9**
Lhcb1.3	19.53	21.49	**110.1#**	28.53	25.78	**90.3**	33.50	26.31	**78.5**	55.22	15.46	**28.0**	31.42	5.86	**18.6**
	0.86	*1.06*	**5.4**	*0.68*	*0.81*	**2.8**	*2.41*	*0.69*	**2.1**	*2.03*	*1.02*	**1.9**	*1.93*	*0.34*	**1.1**
Lhcb1.4	34.24	15.69	**45.8**	44.52	17.61	**39.6**	16.51	15.54	**94.2#**	73.66	1.90	**2.6**	41.65	1.12	**2.7**
	1.72	*0.76*	**2.2**	*1.34*	*0.43*	**1.0**	*1.56*	*0.90*	**5.5**	*2.41*	*0.16*	**0.2**	*1.32*	*0.08*	**0.2**
Lhcb2.1+ Lhcb2.2	102.73	76.96	**74.9**	67.68	64.56	**95.4#**	79.24	108.10	**136.4**	156.20	25.84	**16.5**	73.52	16.45	**22.4**
	5.25	*4.44*	**4.3**	*2.70*	*2.74*	**4.0**	*6.25*	*1.21*	**1.5**	*4.99*	*2.00*	**1.3**	*6.14*	*1.07*	**1.5**
Lhcb2.2	27.71	25.62	**92.4#**	21.97	21.17	**96.4#**	14.40	20.40	**141.6**	30.35	5.85	**19.3**	21.64	5.27	**24.4**
	1.11	*1.46*	**5.3**	*1.06*	*0.55*	**2.5**	*1.04*	*0.79*	**5.5**	*1.23*	*0.53*	**1.7**	*1.62*	*0.33*	**1.5**
Lhcb3.1+ Lhcb3.2	31.05	23.68	**76.3**	26.93	16.84	**62.5**	25.31	15.87	**62.7**	80.91	9.68	**12.0**	19.52	2.27	**11.6**
	3.53	*1.20*	**3.9**	*2.52*	*0.75*	**2.8**	*2.92*	*0.92*	**3.6**	*2.25*	*0.79*	**1.0**	*1.55*	*0.21*	**1.1**
Lhcb4.1+ Lhcb4.2	26.55	18.46	**69.5**	21.44	18.68	**87.1**	23.98	25.21	**105.1#**	46.40	6.99	**15.1**	32.71	7.28	**22.2**
	1.75	*1.33*	**5.0**	*2.76*	*1.86*	**8.7**	*2.02*	*3.91*	**16.3**	*1.57*	*0.61*	**1.3**	*1.21*	*0.79*	**2.4**
Lhcb4.1	0.58	0.39	**68.3**	0.47	0.37	**79.0**	0.53	0.80	**151.2**	0.94	0.16	**16.9**	0.51	0.16	**31.5**
	0.02	*0.02*	**3.5**	*0.01*	*0.01*	**2.4**	*0.04*	*0.01*	**2.3**	*0.04*	*0.01*	**1.2**	*0.03*	*0.01*	**1.9**
Lhcb5	75.50	90.09	**119.3**	79.54	86.04	**108.2#**	105.48	116.96	**110.9#**	201.13	38.31	**19.0**	137.75	39.54	**28.7**
	1.90	*4.47*	**5.9**	*2.04*	*2.80*	**3.5**	*7.94*	*3.80*	**3.6**	*4.71*	*2.46*	**1.2**	*3.92*	*2.27*	**1.6**
Lhcb6.1+ Lhcb6.2	41.72	28.91	**69.3**	27.12	21.66	**79.9**	38.64	29.66	**76.8**	73.57	5.05	**6.9**	28.13	4.73	**16.8**
	1.14	*2.47*	**5.9**	*0.97*	*2.46*	**9.1**	*2.97*	*1.02*	**2.6**	*2.60*	*0.32*	**0.4**	*1.15*	*0.29*	**1.0**
Lhcb6.2	23.73	16.26	**68.5**	18.76	13.29	**70.8**	16.65	14.72	**88.4#**	37.75	2.10	**5.6**	21.06	1.79	**8.5**
	0.74	*1.00*	**4.2**	*0.68*	*0.58*	**3.1**	*1.58*	*0.47*	**2.8**	*0.85*	*0.17*	**0.4**	*0.62*	*0.11*	**0.5**
Lhcb7	0.25	0.35	**140.8**	0.29	0.44	**151.7**	0.17	0.28	**157.8**	0.44	0.55	**125.4**	0.41	0.60	**145.1**
	0.02	*0.02*	**9.0**	*0.02*	*0.03*	**9.4**	*0.02*	*0.02*	**12.5**	*0.01*	*0.04*	**9.6**	*0.04*	*0.05*	**11.6**
Lhcb8	5.42	5.22	**96.3#**	2.37	4.27	**180.3**	2.38	4.06	**170.4**	6.51	3.23	**49.6**	3.58	2.48	**69.4**
	0.13	*0.29*	**5.4**	*0.14*	*0.13*	**5.5**	*0.18*	*0.14*	**5.7**	*0.19*	*0.25*	**3.8**	*0.14*	*0.15*	**4.1**

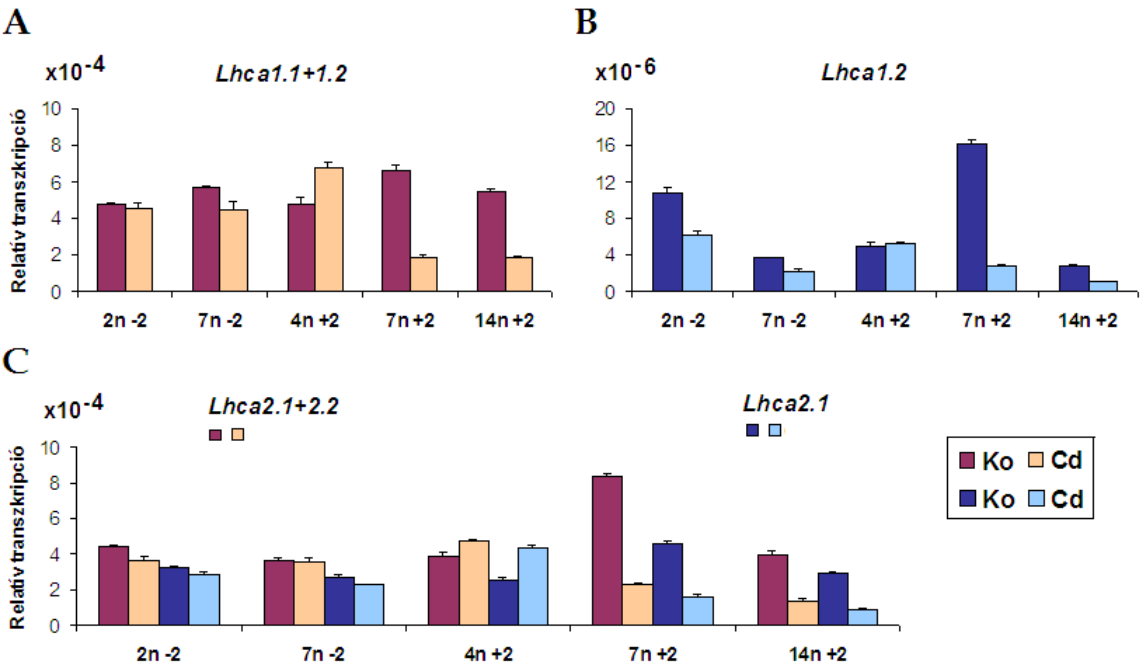
#: nem volt szignifikáns eltérés a kontroll értékétől, p>0,05.

3.2 Az *Lhca* gének transzkripciós szintjének változása

Ha a fehérjéket 2 gén kódolja, az ún. „közös primerek” mindkét génhez specifikusan kötődnek, így mindkét gén terméke hozzájárul a keletkezett DNS mennyiségének növekedéséhez a PCR reakció során. Az eltérő izoformákat kódoló gének közül az egyikre specifikus PCR primereket is terveztünk (10. táblázat).

Az *Lhca1* gének közös reakcióban mért kifejeződési szintje a -2 kontroll mintákban a 2. napról a 7.-re 20%-al emelkedett (24.A ábra). A 4. napos felső levélmintában mért mRNS mennyiség a 2. napossal volt egyenlő, majd ez az érték a 7. napra 40%-al megemelkedett, és a 14. napra az előző szintre csökkent.

A -2 levelekben Cd kezelés hatására a 2. napon nem tapasztaltunk eltérést a kontrolltól, de a 7. napon 20%-al alacsonyabb mRNS mennyiséget detektáltunk. A +2 levelekből származó mintákban a 4. napon mért 40%-os indukciót követően erőteljes csökkenés következett be. A 7. napon a kontrollhoz képest már 70%-al kevesebb mRNS szintetizálódott, ami a 14. napra sem változott (12. táblázat).



24. ábra: Az *Lhca1* (**A, B**, eltérő skálán ábrázolva) és *Lhca2* (**C**) gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. A közös primerekkel végzett PCR reakciókat eltérő színkód jelöli, az együtt szaporított fragmenteket „+” jel köti össze. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt.

Az *Lhca1.2* gén kifejeződési szintje két nagyságrenddel alacsonyabb, mint az *Lhca1.1*. A kontroll mintákban az *Lhca1.1* mRNS-ek mennyisége viszonylag szűk határok között

mozgott. A jóval kisebb mértékben kifejeződő *Lhca1.2* szintje, ezzel szemben, lényeges fluktuációt mutatott (24.B ábra): a -2 levelekben a 2. napról a 7-re kevesebb, mint harmadára csökkent; a +2 kontroll levelekben a 4. naphoz képest a 7. napra megháromszorozódott az mRNS-ek mennyisége, majd ez az érték az ötöd részére csökkent a 14. napra.

A Cd-kezelt alsó levelekben a kontrollnál 40%-al volt alacsonyabb az adott génről származó mRNS molekulák száma. Az átíródás mértéke e felső levelekben kadmium hatására a 4. napon nem változott, de a 7. napra a felére csökkent, mely érték a hozzá tartozó kontrollnak mindössze 17%-át jelenti. A 14. napra további csökkenést mutattunk ki. A kezelt növényben mért érték ebben az esetben a kontroll 37%-ának felelt meg (12. táblázat).

Az *Lhca2.1* és *Lhca2.2* gének transzkripciós aktivitásának kimutatására a „közös" reakción kívül specifikus PCR-t az *Lhca2.1*-re terveztünk. Az 24/C ábrán látható grafikonon együtt tüntettük fel a két reakciót eredményét, mivel a kapott értékek azonos skálára estek. A közös primerekkel végzett mérések eredménye szerint a kontroll minták közül csak a +2 7 napos levél adatai tértek el a többi, szűk határok között mozgó, értéktől. Az eltérés nagyjából kétszeres volt.

A -2 levelekben jelentősebb változást Cd kezelés hatására sem tapasztaltunk. Ugyanakkor a 4 napos +2-es levélben szignifikánsan magasabb mRNS szintet mértünk a megfelelő kontrollhoz képest (12. táblázat), ami a 7. napra oly mértékben lecsökkent, hogy a kontroll értékének mintegy 30%-át tette ki csupán. A kezelés végére további csökkenést mértünk.

A két primerpárral végzett vizsgálatok ugyanolyan előjelű és hasonló mértékű eltéréseket mutattak, bár az *Lhca2.1* mRNS mennyisége a legtöbb mintában 25-30%-al alacsonyabb volt, mint a közös primerpárral detektált érték. Az indukció mértékében lényeges eltérés a Cd kezelést követő 4. napon vett mintában mértünk, ami az *Lhca2.1* esetében 74%-os emelkedést jelentett a megfelelő kontrollhoz képest. A Cd-kezelt növények leveleiben bekövetkező transzkripciós változásokat figyelembe véve, az *Lhca2* gének kifejeződése a -2 levelekben többé-kevésbé állandó volt, míg a +2 levelekben, a kezdeti indukciót követően, fokozatosan csökkent.

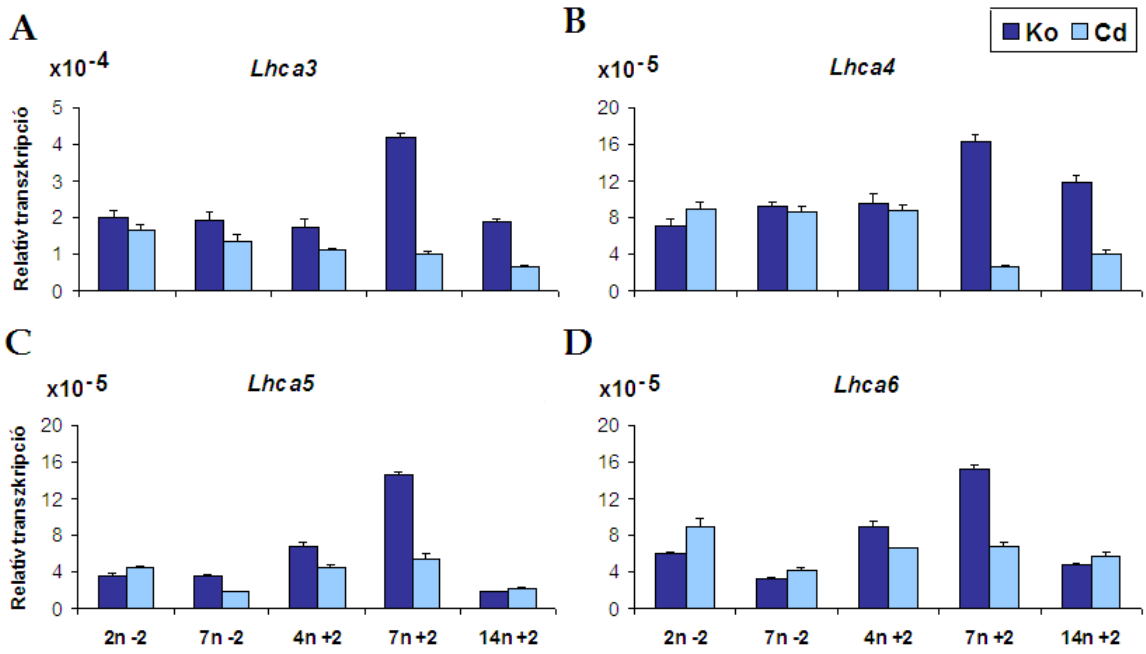
Az Lhca3-Lhca6 fehérjéket egy-egy gén kódolja a genomban. Az *Lhca3* átíródása a kontroll levelekben hasonló mértékű volt. Kiugróan magas értéket a 7 napos felső levél mutatott, ami nagyjából kétszerese volt a többinek.

A -2 levelekben Cd kezelés hatására a 2. napon 20%-os, majd a 7. napon 30%-os gátlást mértünk (25.A ábra). A +2 Cd-kezelt levelekben jól látható a kifejeződés fokozatos

csökkenése. A kontrollhoz képest 40%-os, 75%-os és 65%-os esést tapasztaltunk (12. táblázat).

Az *Lhca4* mRNS-ek mennyisége a -2 kontroll levelekben csak kis mértékben tért el egymástól. A +2 kontroll levél a 4. napon hasonló szintet mutatott, mint a -2 levélminták. A hetedik napon azonban 60%-al megemelkedett a transzkripció szintje, majd a 14. napra lecsökkent (25.B ábra).

Az -2 levelekben, Cd hatására a 2. napon 25%-os serkentést tapasztaltunk, ezzel szemben a 7. napon már nem kaptunk szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. A +2 levelekben a kezelés 4. napján nem látható eltérés a Cd hatására, ellenben a 7. napra az mRNS-ek mennyiségében erőteljes esés következett be, a kontroll értékének csupán 16%-át tette ki. A 14 napra kissé emelkedett a transzkripció szintje a kadmium kezelt levélben (12. táblázat).



25. ábra: Az *Lhca3-Lhca6* gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

Az *Lhca5* mRNS-ek mennyisége a -2 kontroll levélmintákban azonos szinten volt a második és hetedik napon is (25.C ábra). A legfiatalabb felső kontroll levélben az mRNS-ek mennyisége duplája a -2 levelekének, majd értéke a 7. napra ismételten megkétszereződött. A 14. napos levelekben azonban erősen lecsökkent.

Cd kezelés hatására a -2 levelekben a kezdeti (2n -2) szignifikáns mértékű serkentést követően a 7. napra 50%-os visszaesés következett be (12. táblázat). A kezelt minták felső levelében a 4. napon az átíródás mértéke a kontroll 67%-a volt, ami a 7. napra sem változott lényegesen. Meg kell említeni azonban, hogy, a megemelkedett kontroll értékének csupán 37%-át tette ki. Csak a kadmiummal kezelt leveleket figyelembe véve a transzkripció mértéke a 14. napra lecsökkent, ugyanakkor nincs szignifikáns eltérést a 14 napos kezelt és kontroll levél transzkripciós szintjében, azaz mindkettő nagyon alacsony.

Az *Lhca6* gén esetében a -2 kontroll levélben a 7. napon mért mRNS szint a 2. napinál kétszer alacsonyabb volt (25.D ábra). A +2 kontroll levelekben mért transzkripciós szintek kisebb mértékű, bár hasonló ingadozást mutattak, mint az *Lhca5* mRNS-ek.
2. napos Cd kezelt -2 levélmintában mért emelkedés 50%-os volt a kontroll értékéhez képest. A transzkripció serkentését a 7. napos levelekben is megfigyeltük bár itt az előzőnél alacsonyabb értékeket mutattak a kezelt és kontroll levelek is. A Cd-kezelt minták felső levelében az mRNS-ek mennyisége alig különbözött egymástól, viszont az emelkedő, majd csökkenő kontroll értékekhez képest a 4. napon 27%-os, a hetedik napon 56%-os gátlást mértünk, a 14. napon pedig szignifikáns mértékű indukciót tapasztaltunk (12. táblázat).

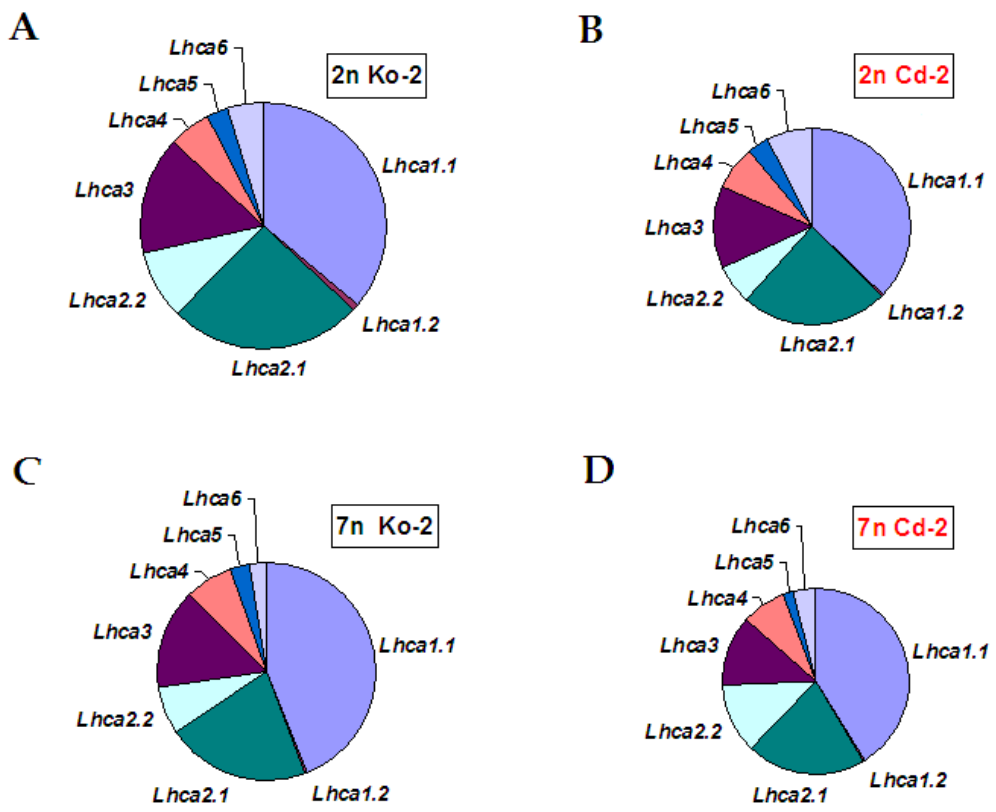
3.3 Az *Lhca* gének expressziójának mértéke és egymáshoz viszonyított arányai

A transzkripció változás jellemzésére tanulmányoztuk az *Lhca* mRNS-ek összmennyiségének változását, valamint az egyes gének mRNS-einek az összmennyiséghez való hozzájárulását. Az *Lhca* tagok mintánként vett relatív mRNS szintjének összegét ábrázoltuk a 26. és 27. ábrán százalékos megoszlásban. Az *Lhca1.1* és az *Lhca2.2* gének mRNS-einek mennyiségét úgy kaptuk meg, hogy a megfelelő közös reakcióban kapott értékekből kivontuk az *Lhca1.2*, illetve az *Lhca2.1* génre vonatkozó értéket.

A 26. ábrán látható, hogy a -2 kontroll levelekben az *Lhca* mRNS-ek összmennyisége a 7. napra a 2. napon mért érték felére csökkent (v.ö. 26.A és C ábra). A Cd kezelt minták a 2. napon a kontroll érték felét (26.B ábra), a 7. napon pedig annak mintegy 80%-át tették ki (26.D ábra).

A -2 levelekből vett mintákban az egyes *Lhca* gének mRNS-ei egymáshoz képest hasonló arányban voltak jelen. Legnagyobb mértékben reprezentáltak az *Lhca1.1* mRNS-ek, az összmennyiséghez viszonyítva 36-44%-ot tesznek ki mintánként. Szintén viszonylag

nagyobb mértékben íródott át az *Lhca2.1*, melynek mRNS-ei 20-25%-ot képviseltek. Az *Lhca3* 12,5-15,5%-al, míg a többi *Lhca*-ra egyenként 10-nél kisebb százalékos arány jutott. A legalacsonyabb szintű transzkripciót az *Lhca1.2* génre kaptunk, ami 1%-nál is kevesebb. Kadmium hatására ezen arányok egyes gének esetében szignifikánsan megváltoztak. Az *Lhca2.2* mRNS-ek 9,2%-ot képviseltek a két napos kontrollban, a megfelelő Cd kezelt mintában pedig 6,6%-ot, ami a 7. napra már több mint 12%-ra emelkedett. Az *Lhca6* mRNS-ek aránya szintén jelentős eltérést adott. A két napos alsó kontroll mintában 4,6% volt, ugyanakkor a vele egykorú kadmiumosban 7,4%-ot tett ki. A 7. napra a kontroll és a kadmiumos mintában is csökkent ennek a génnek a transzkripciós szintje.

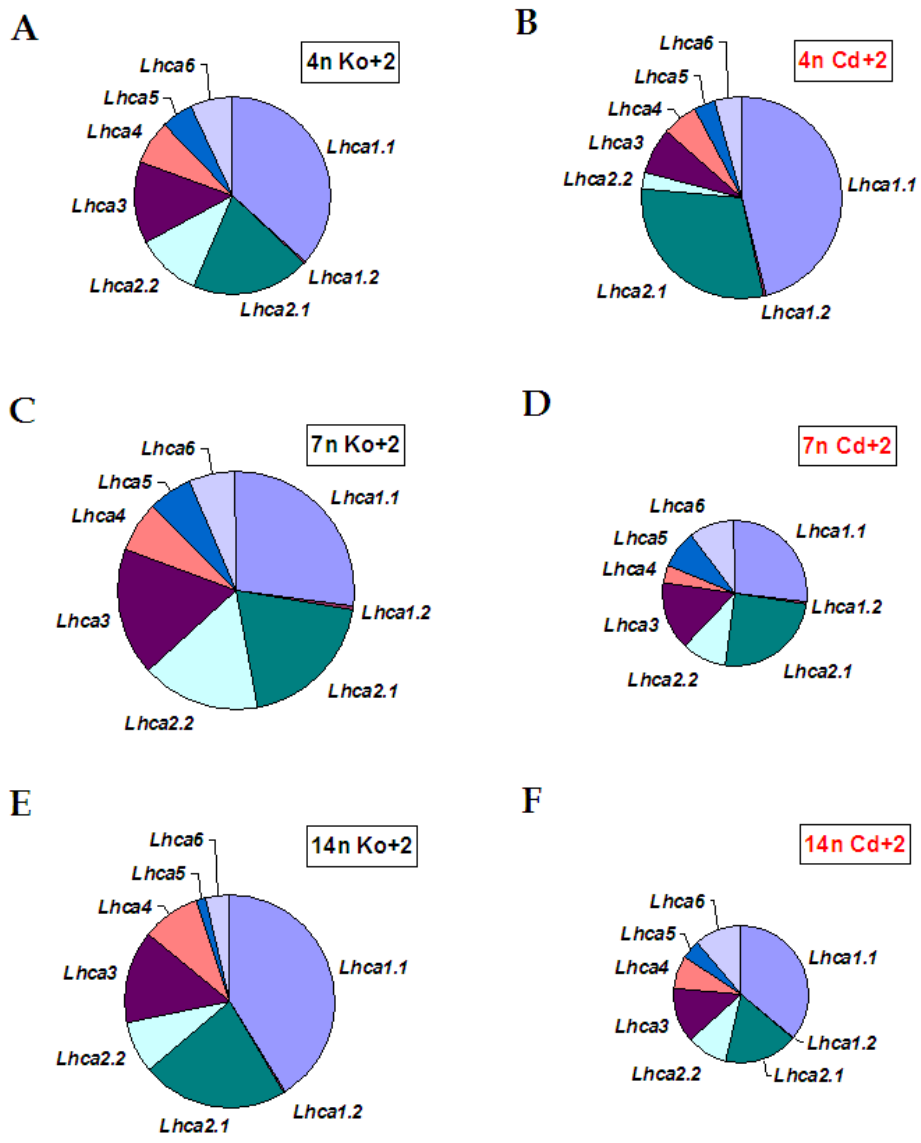


26. ábra: Az *Lhca* gének kifejeződési mennyisége és aránya az alsó levelekben. Az *Lhca* mRNS-ek összmennyisége a kör területével arányos. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

A 4. napos kontroll növény +2-es leveleiben az *Lhca* mRNS-ek összmennyisége ugyanannyi volt, mint a -2 levelekben. A 7. napra aztán majdnem a kétszeresére emelkedett, majd a 14. napra visszaállt az eredeti szintre (27. ábra). A Cd-kezelt mintákban a 4. napon mért összes mRNS értéke kissé magasabbnak adódott a kontrollénál, majd a 7. napra ez a felére csökkent, ami a megfelelő kontrollhoz viszonyítva csak 25%-ot tett ki. A 14. napon az abszolút értékben további csökkenést mértünk.

Az egyes *Lhca* mRNS-ek a kontroll növények+2 leveleiben is hasonló arányt mutattak egymáshoz viszonyítva, mint a -2 levelekben. Lényegesen eltérő arányokat az *Lhca1.1* mRNS-ek adtak. Értékük rendre 36-, 27- és 41% volt. Szintén nagyobb ingadozást mutatott az *Lhca5*. A 4. napon a összes mRNS mennyiségének 5,3%-át tette ki, ami enyhén megemelkedett a 7. napra, majd 1,4%-ra csökkent az utolsó időpontban vett mintában. Az *Lhca6* gén mRNS-e 7% körüli értéket képviselt a 4. és 7. napon, ugyanakkor az utolsó mintában már csak 3,6%-ot.

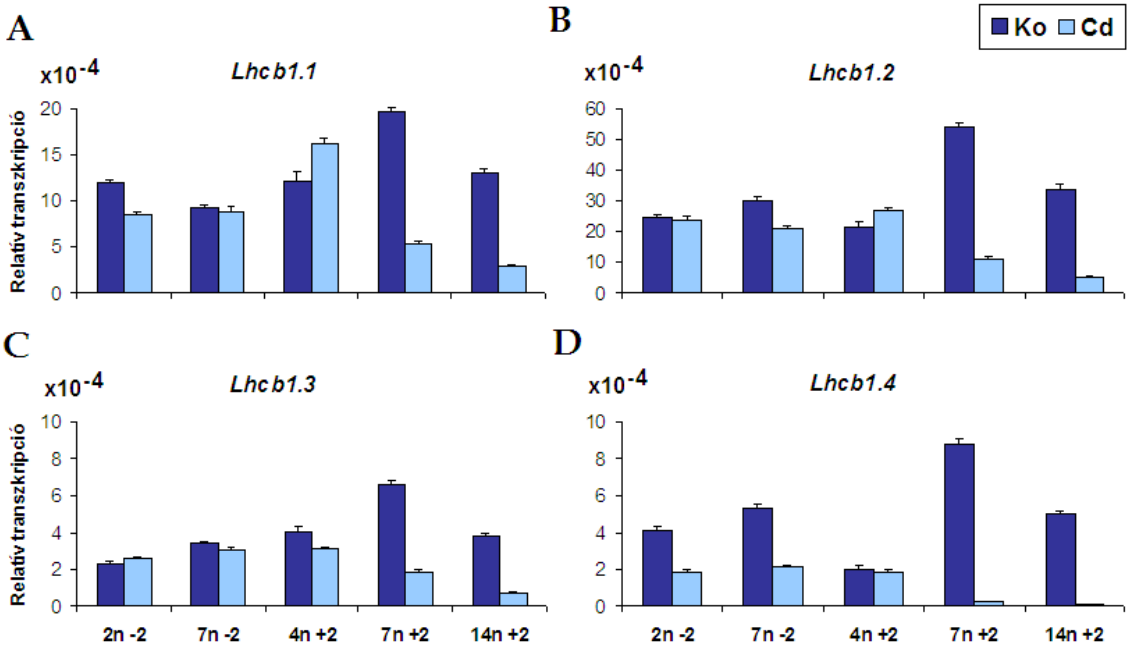
Cd kezelés hatására az *Lhca* gének kifejeződési arányában jelentős eltolódást a legfiatalabb +2-es levelekben mértünk (27.B ábra). Az *Lhca1.1* gén mRNS-ei a 4. napos kontroll mintában 37%-ot képviselték, ehhez képest az azonos korú Cd-kezelt mintában 46%-ot. Az *Lhca2.1* mRNS-einek aránya a kontrollban mért 20%-ról Cd kezelés hatására 30%-ra emelkedett. Ezzel egyidejűleg az *Lhca2.2* mRNS szintje 10%-ról 2,5%-ra csökkent. Szintén csökkent kadmium hatására az *Lhca3* mRNS-ek előfordulási aránya. A kontroll levélben 14%-ot képviseltek, míg a kezelt mintában csak 7,5%-ot. Kisebb mértékű csökkenést mutattunk ki az *Lhca4-6* mRNS-ek arányában is. A 7. napos Cd kezelt levélben az *Lhca* mRNS-ek összmennyisége jelentősen csökkent, ugyanakkor az egyes tagok aránya a kontrollban mérttől csak kismértékben különbözött (27.D ábra). Az összmennyiség a 14. napra további csökkenést mutatott, s ezzel együtt kismértékű változás az arányokban is bekövetkezett (27.F ábra). Szignifikánsan megemelkedett az *Lhca5* és *Lhca6* mRNS-ek aránya, az előbbi esetében a kontrollban mért 1,4%-hoz képest 4,4%-ra, az utóbbi estében 3,6%-ról 11,5%-ra.



27. ábra: Az *Lhca* gének mennyisége és kifejeződési aránya a felső levelekben. Az *Lhca* mRNS-ek összmennyisége a kör területével arányos. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

3.4 Az *Lhcb* gének transzkripciós szintjének változása

Az *Lhcb1* fehérje valószínűsített izoformáit 4 különböző gén kódolja a nyárfa genomban, az *Lhcb1.1-1.3* gének különösen hasonló szekvenciával rendelkeznek, ezért megkülönböztetésükre a 3' végi fehérjét nem kódoló régióra terveztünk egyenként specifikus primereket. Az *Lhcb1.4* gén szekvenciája a többi 3 géntől jobban eltért, ezért megkülönböztetésére könnyebben találtunk két olyan szakaszt, ahová a PCR-hez szükséges specifikus oligonukleotid szekvenciákat tudtunk tervezni.



28. ábra: Az LHCII antennát alkotó *Lhcb1*gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

Az Lhcb1 fehérje izoformáit kódoló gének kifejeződésük mértékében némileg különböztek egymástól. Legnagyobb mennyiségben az *Lhcb1.2* termékei voltak jelen, az *Lhcb1.1* átlagosan fele annyi mRNS-t szintetizált. Ez utóbbihoz képest nagyjából egyharmad résznek felelt meg az *Lhcb1.3* génről készült mRNS-ek száma, és az *Lhcb1.4* gén is hasonló mértékben volt reprezentált (28. ábra).

Az *Lhcb1.1* gén kifejeződése a -2 kontroll mintákban csak kismértékben tért el egymástól. A 4. napos kontroll +2 levélből származó minta a 2. napos -2 levélhez hasonló mRNS szintet produkált, ami aztán a 7. napra mintegy 30%-al növekedett, majd a 14. napra visszaállt a kezdeti szintre.

A -2 levelekben a Cd kezelés 2. napján 30%-os gátlást mértünk, ami aztán a 7. napra megszűnt (28.A ábra). A +2 Cd kezelt levelekben mért transzkripciós szint a 4. napon 33%-al volt magasabb a kontrollnál. A 7. napra azonban oly mértékben lecsökkent, hogy a kontroll 25%-át érte csak el, majd további csökkenést mutatott (12. táblázat).

Az *Lhcb1.2* transzkripciója az előzőhöz nagymértékben hasonló mintázatot adott (28.B ábra). A -2 levelekben a 2. napról a hetedikre mintegy 20%-al emelkedett a mRNS-ek mennyisége. A 2. napos -2 levélhez volt hasonló a fiatal +2 levél mRNS szintje, ami aztán a 7. napra kétszeresére növekedett és ezt követően a 14. napra lényegesen lecsökkent.

A Cd kezelés hatása a -2 levelekben csak a 7. napon mutatkozott meg, 30%-os gátlást idézve elő. A +2 levelekben Cd hatására a 4. napon szignifikáns mértékű indukciót mértünk, ami aztán gátlásba ment át, és a 7. napon a kontroll mRNS szint mindössze 20%-át tette ki. A kezelés végére értéke tovább csökkent.

Az *Lhcb1.3* gén mRNS-einek mennyisége a kontroll -2 leveleiben mintegy 30%-os különbséget adott a 7 napos minta javára (28.C ábra). A kontroll növény 4. napos +2 levélében a gén némileg nagyobb mértékben fejeződött ki, értéke azután a 7. napra több mint másfélszeresére nőtt, majd a 14. napra visszacsökkent.

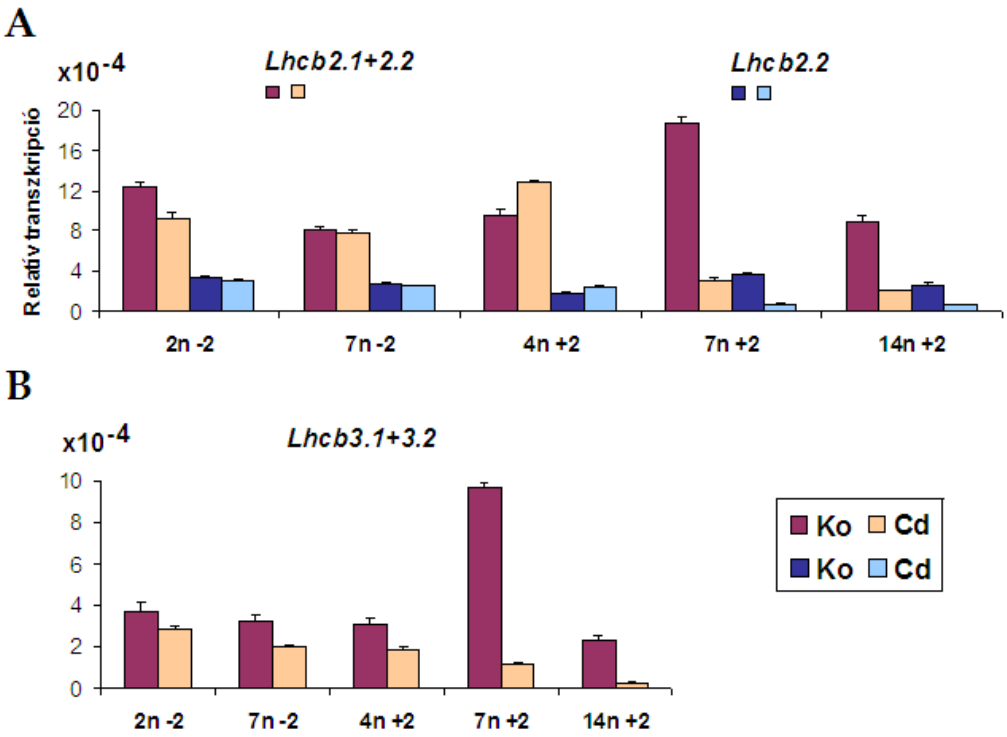
A -2 levelekben a gén kifejeződését a Cd kezelés nem változtatta meg szignifikánsan, viszont mindegyik +2 levélben csökkent a transzkripció szintje a kontrollhoz képest. Az első mintában a kontroll érték 78%-át képviselte, a következő mintában 28%-os relatív értéket mutatott, a kezelés végén pedig már csak 18%-ot.

A kontroll növényekben az *Lhcb1.4* gén transzkripcióját vizsgálva kimutattuk, hogy annak szintje a -2 levelekben a másodikról a hetedik napra 20%-al megnövekedett (28.D ábra). A 4. napos felső levélben a -2 levelekhez képest fele annyi mRNS-t detektáltunk. Ez az érték a 7. napra több mint négyszeresére emelkedett, majd a 14. napra a -2 levelekben mérhető szintre csökkent.

A kadmium kezelt növény alsó levélmintáiban az *Lhcb1.4* mRNS-ek mennyisége a kontroll mintegy 40%-át tette ki és időben nem változott. A +2 levelekben a 4. napos minta értéke nem tért el a kontrolltól, a kezelés előrehaladtával azonban szinte teljes mértékű gátlás alakult ki. A 7. és 14. napon a kontroll értékének kevesebb, mint 3%-át képviselte (12. táblázat).

Az *Lhcb2.1* és *Lhcb2.2* gének feltételezhetően két eltérő fehérje izoformát kódolnak. A két gén transzkripciós szintjének mérésére egy un. „közös” primerpárt, valamint az *Lhcb2.2* esetében specifikus primerpárt is terveztünk. A közös primerpárral végzett qPCR eredményei átlagosan 3-4-szer nagyobb értékeket képviseltek az egyes mintákban, mint az *Lhcb2.2* mRNS szintje külön mérve (29.A ábra).

A két gén kifejeződését együtt vizsgálva a -2 kontroll levelekben 30%-al magasabb értéket képviselt a 2. napos minta, mint a 7. napon vett. A +2 kontroll levelekben a mintavétel kezdetén a -2 mintákhoz hasonló mRNS mennyiséget mértünk. Ez az érték a 7. napra megkétszereződött, végül visszatért a 4. napos értékre.



29. ábra: Az LHCII antennát alkotó *Lhcb2* és *Lhcb3* gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

Cd kezelés hatására a -2 levelekben a 2. napon a 25%-os csökkenést detektáltunk, míg a 7. napon nem találtunk szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. A +2 levelekből származó 4 napos, Cd kezelt mintában a kontrollnál 36%-al magasabb transzkripciót mértünk, azonban a 7. napra drasztikus mértékű gátlás alakult ki. Az mRNS szint a kontroll értékének csak 16%-át érte el, és a kezelés végén még további csökkenést figyeltünk meg.

Az *Lhcb2.2* primerpárral elvégzett reakcióban a -2 kontroll levelekből a 2. napon vett mintánál a 7. napi 20%-al alacsonyabb értéket adott. A +2 kontroll levélből származó 4. napos minta a -2 levelek értékénél lényegesen alacsonyabb szintet mutatott. A 7. napra ez az érték megkétszereződött, majd a 14. napra enyhén lecsökkent, de még mindig meghaladta a 4. napon mért mRNS mennyiséget.

A Cd kezelés a -2 levelekben nem idézett elő szignifikáns változást az *Lhcb2.2* mRNS-ek mennyiségében, ugyanakkor a 4 napos +2 levélben mintegy 40%-al megemelte azt. A további két mintavételi időpontban azonban a gén transzkripciója, a megfelelő kontroll értéknek 19- ill. 24%-ára csökkent.

Az Lhcb3 fehérje esetében is 2 kódoló régiót találtak a genomban. A két fehérje mindössze egy aminosavban különbözik. A nukleinsav szekvencia olyan mértékű azonosságokat adott, hogy egyik génre sem tudtunk külön, specifikus primerpárt tervezni, ezért transzkripciójuk mértéket együtt vizsgáltuk (29.B ábra). A kontroll -2 levelek mRNS szintje kis mértékben különbözött. Ehhez hasonló volt a 4. napos +2 kontrollban mért transzkripció, melynek szintje a 7. napra több mint háromszorosára emelkedett, majd az utolsó mintavételnél visszaállt az előzőhöz közeli értékre.

A Cd kezelés következtében csökkent az átíródás mértéke: a -2 levelekben a 2. napos mintában 25%-al, a 7. naposban pedig majdnem 40%-al; a +2 levelekben az mRNS mennyiség a 4. napon a kontroll érték 62%-át, majd a 7. és 14. napon a megfelelő kontrollok csupán 12%-át tette ki.

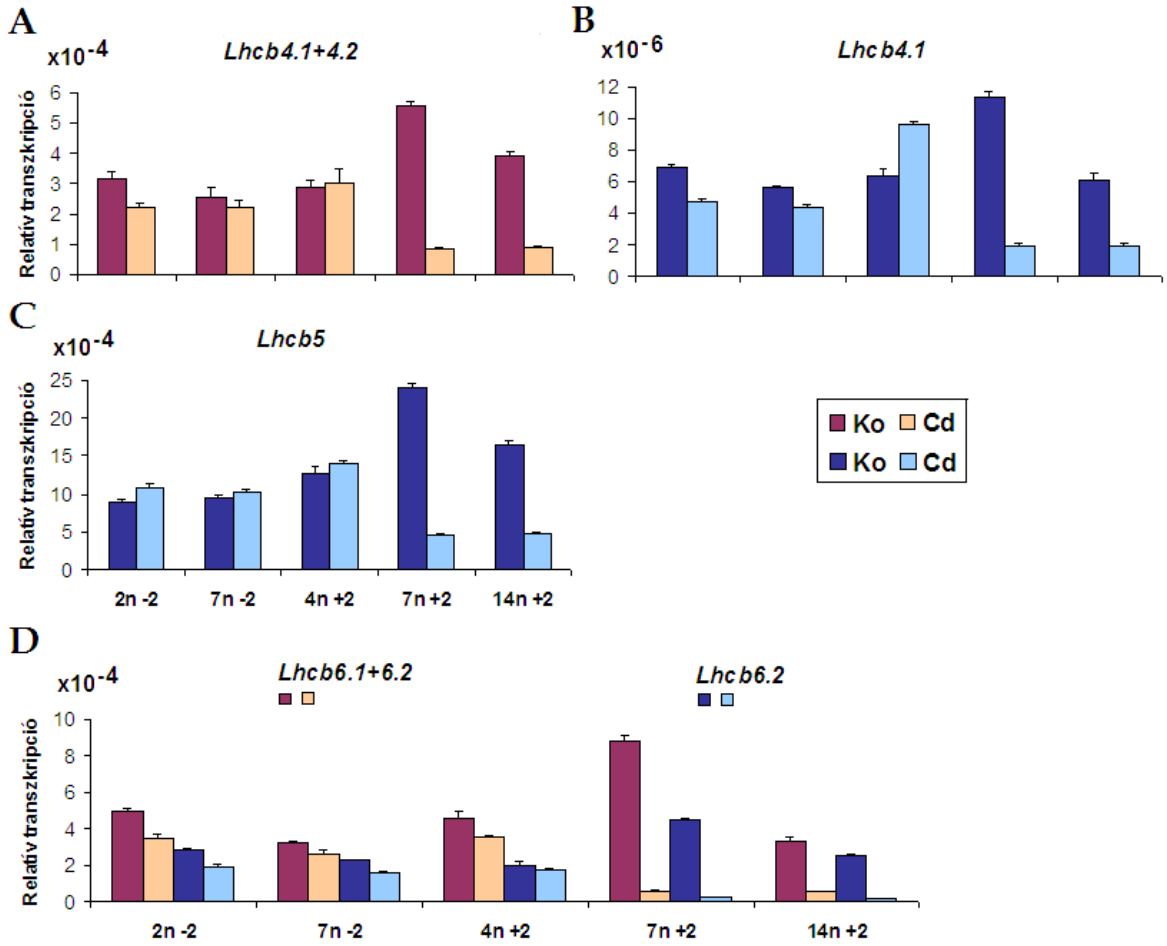
Az Lhcb4 fehérje izoformáit is két gén kódolja a genomban. Transzkripciójuk vizsgálatára terveztünk egy „közös” és egy az *Lhcb4.1* szekvenciára specifikus primerpárt. A Real-Time esszék eredményei között két nagyságrend különbséget kaptunk, a közös primerekkel végzett reakció javára (v. ö.: 30.A és B ábra). Ezért ennek a mérésnek az eredményei főleg az *Lhcb4.2* gén átíródását tükrözik, mivel a közös PCR során termékei az adataink alapján lényeges túlsúlyban voltak az *Lhcb4.1* gén termékéhez képest.

A közös primerekkel végzett PCR reakcióban a két alsó kontroll minta között 20%-nyi mRNS-szint különbséget mértünk, a kétnapos minta javára (30.A ábra). A 4. napos +2 kontroll levél adatai a -2 levelek értékei közé estek. A 7. napra az *Lhcb4* mRNS-ek szintje a korábbi kétszeresére emelkedett, majd a vizsgált időszak végére csökkenést mutatott.

A két napos Cd kezelt alsó levélmintában 30%-al kevesebb transzkriptum volt jelen, mint az azonos kontrollban. A 7. napon Cd kezelt és a kontroll minta között szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A Cd kezelés a 4. napos +2 levélmintában sem okozott kimutatható változást a gének kifejeződésében. Radikális csökkenést a 7. napon tapasztaltunk, és változatlanul alacsony értéket mértünk a kezelés végén is (12. táblázat).

A két nagyságrenddel kisebb mértékben kifejeződő *Lhcb4.1* mRNS mennyisége a kontroll mintákban viszonylag szűk tartományban mozgott, mindössze a 7. napos +2 levél képviselt a többinél nagyjából kétszer magasabb értéket (30.B ábra).

A Cd kezelés a -2 levelekben mért transzkripciót negatívan befolyásolta, a 2. napon 30%-os, a 7.-en 20%-os csökkenést mértünk. A +2 levélmintákban azonban eltérő előjelű változásokat idézett elő. A 4. napos levélben a kontrollhoz képest 50%-os indukciót tapasztaltunk, melynek értéke a 7. napra majdnem ötöd részére csökkent, így a kontrollnak mintegy 15%-át tette ki, és változatlanul alacsony volt a 14. napon is.



30. ábra: A kapcsoló antennát alkotó *Lhcb* gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

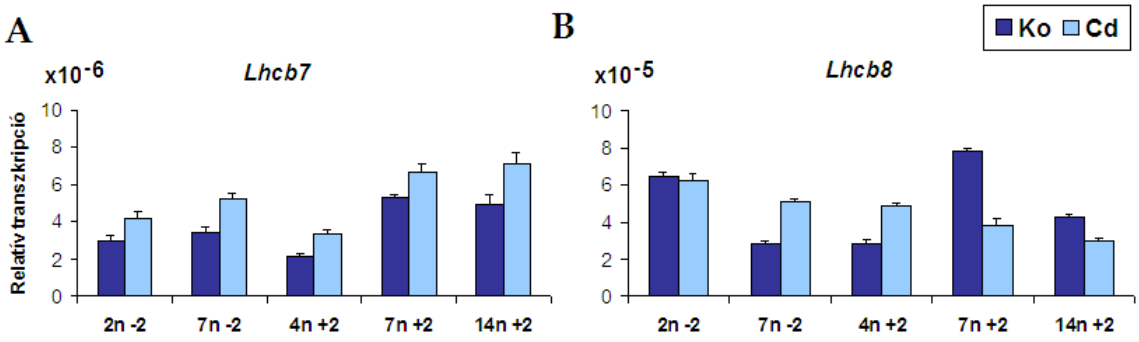
Az *Lhcb5* gén transzkripció aktivitásának változását vizsgálva a -2 kontroll levelekben hasonló mRNS szintet mértünk és Cd hatására sem mutatkozott szignifikáns eltérés (30.C ábra). A 4. napos felső kontroll levélben a -2 leveleknél magasabb mRNS mennyiséget mértünk, ami a 7. napon csaknem kétszeresére emelkedett, majd a mintavétel végére újra lecsökkent.

A Cd kezelés a 4. napos mintában nem okozott szignifikáns eltérést a kontrolltól, ám a 7. napra lényegesen alacsonyabb transzkripciót mutatott, a kontrollnak mindössze 20%-át tette ki, bár értéke a 14. napra sem változott a kontrollhoz viszonyítva nagyjából 30%-nak adódott (12. táblázat).

Az *Lhcb6.1* és *Lhcb6.2* gének aktivitását kimutató „közös” reakción kívül specifikus PCR primereket az *Lhcb6.2*-re terveztünk. A közös primerekkel végzett mérés eredményei szerint a -2 kontroll mintákban a 2. napon mért mRNS szint a 7. napra a 2/3-

ára csökkent (30.D ábra), míg a +2 4. napos kontroll levélben a 2 napos alsó mintához hasonló volt. A 7. napra ez csaknem megkétszereződött majd a 14. napra újra lecsökkent. Mindkét Cd-kezelt mintában gátlást tapasztaltunk a -2 levelekben, ami rendre 20- és 30% volt (12. táblázat). A +2 levelekben 25%-os mRNS szint csökkenést mértünk a 4. napon, amely érték a 7. napra drasztikusan leesett, így a kontrollhoz képest csak 7%-ot képviselt. A kezelés végén további csökkenést mértünk.

Az *Lhcb6.2* gén expressziós mintázatában ugyanilyen tendenciákat mértünk a kontroll és kezelt levelekben. A két reakcióban mért transzkripció szintek között átlagosan másfél-kétszeres eltérés mutatkozott csupán, a közös reakció javára. Így valószínűsíthető, hogy az *Lhcb6.1* gén párjához képest hasonló, bár némileg kisebb mértékben íródik át. A két mérés értékeinek különbsége (az adatokat nem mutatjuk) lehetővé tette számunkra, hogy következtessünk az *Lhcb6.1* mRNS szintjének változására. A kapott mintázat szintén igen hasonlónak bizonyult a 30./D ábrán bemutatotthoz. Eltérést a 14. napos felső kontroll levél mRNS szintjében adódott, ez lényegesen lecsökkent, a 7. napos érték felét tette ki mindössze. Ebből következően, bár a megfelelő Cd kezelt mintákban az mRNS szint azonos volt, a 7. napon mért érték a kontroll 8,5%-ának adódott, mely a 14. napra 40%-ra emelkedett.



31. ábra: Az un. „minor *Lhcb*" gének transzkripciós szintjének változása a kezelés során. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

Az *Lhcb7* gén mRNS szintje a -2 kontroll mintákban csak enyhe eltérést adott. A +2 levélben a 4. napon mért érték hasonló volt a -2 levelekben mért értékekhez, majd a 7. napra több mint kétszeresére emelkedett, és a 14. napra is hasonlóan magas maradt.
A Cd kezelés a -2-es levelekből származó 2 napos mintában 40%-os, a 7 naposban 50%-os transzkripciószint növekedést okozott a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanígy emelkedést

mértünk a +2 levelekben is, a kontroll értékhez képest 60-, 25-, és 45%-os növekedést kaptunk.

Az *Lhcb8* mRNS-ek mennyisége a 2. napról a 7. napra több mint felére csökkent a -2 kontroll levelekben (31.B ábra). A +2 levélminták értékei is erősen különböztek egymástól. A 4. napon mért viszonylag alacsony szintről a 7. napra 2,5-szeresére emelkedett az mRNS mennyisége, míg a harmadik mintában újból jelentősen lecsökkent.
A -2 levelekben a Cd kezelés a két napos mintát nem befolyásolta, viszont a 7 napos mintában 80%-al emelte az mRNS szintet. Hasonló serkentést mértünk a 4 napos +2 mintában is, ahol az mRNS mennyisége 70%-al volt magasabb a kontrollnál. Ezt követően azonban fokozatos csökkenést tapasztaltunk, a 7. napon a kontrollhoz viszonyítva 50%, a kezelés végén 70% körüli mRNS szintet mértünk (12. táblázat).

3.5 Az *Lhcb* gének expressziójának mértéke és egymáshoz viszonyított aránya

Az *Lhcb* mRNS-ek összmennyiségének és százalékos arányainak változása mintánként a 32. és 33. ábrán látható. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért az *Lhcb2*, *Lhcb4* és *Lhcb6* esetében csak a közös primerekkel végzett reakciók eredményeit vontuk be a számolásba, bár a párok közül az egyikre külön specifikus reakciót is terveztünk.

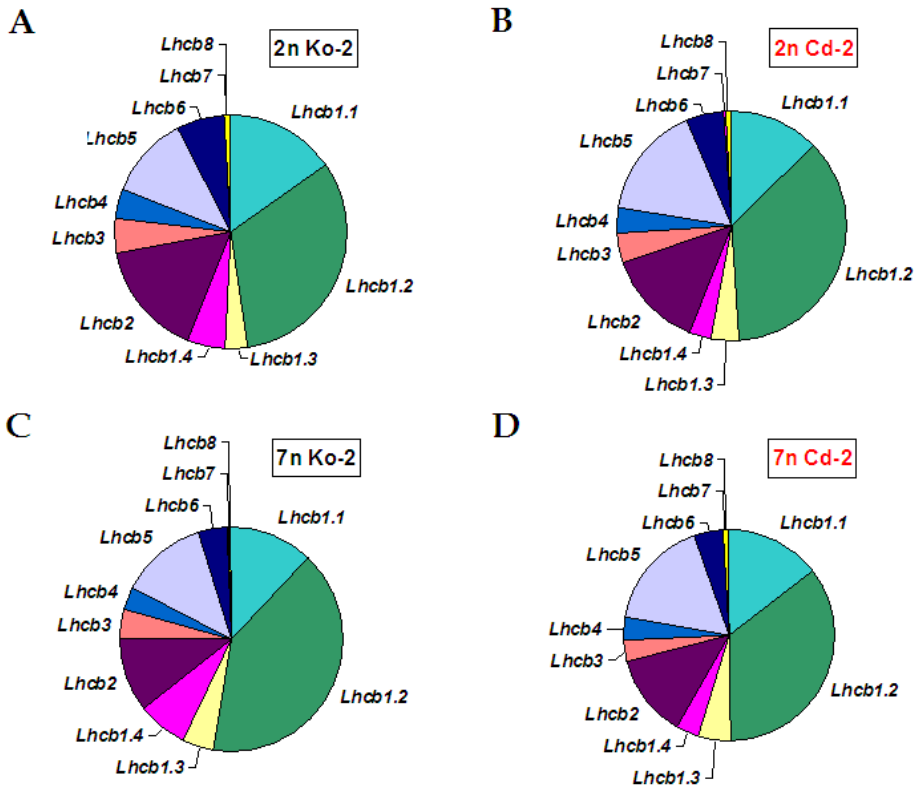
A két alsó kontroll mintában az összes *Lhcb* transzkriptum mennyisége azonosnak tekinthető (32. ábra). Hozzájuk képest a Cd kezelt mintákban enyhe mértékű, mintegy 15-20%-os csökkenést mértünk.

Az egyes *Lhcb* génekről átíródó mRNS-ek arányában sem a kontroll, sem a kezelt minták esetében nem tapasztaltunk jelentős eltérést a -2 levelekben. Legnagyobb arányban találhatók az *Lhcb1* mRNS-ek, melyek, az összmennyiséghez viszonyítva átlagosan 60%-ot tettek ki. Az egyes izoformákat reprezentáló mRNS-ek aránya azonban jelentősen különbözött. Az összes *Lhcb* mRNS 32-40%-át a legnagyobb mennyiségben képződő *Lhcb1.2* adta, ettől jóval kevesebb, 12-15%-ot tett ki az *Lhcb1.1*. Mindössze 3-5%-ot képviselt az *Lhcb1.3*, az *Lhcb1.4* aránya pedig 2,8-7% között változott. Szintén jelentős mennyiségben voltak jelen az *Lhcb2* és *Lhcb5* gének mRNS-ei, amelyek egyenként 11-16%-ot adtak. A kisebb mértékben kifejeződő *Lhcb6* 4-6%-ot képviselt, az *Lhcb3* és *Lhcb4* egyenként 3-4% között mozgott. Az *Lhcb8* génre 1%-nál kevesebb, az *Lhcb7*-re pedig 0,1% alatti részesedés jutott.

A +2 kontroll levelekben az *Lhcb* mRNS-ek összmennyisége a 4. napról a 7.-re több mint kétszeresére nőtt, majd a 14. napra erősen lecsökkent (33. ábra). A kadmium

kezelt mintákban a 4. napon mért *Lhcb* transzkriptum kissé többnek adódott a kontrollénál, majd a 7. napra ez abszolút értékben csaknem a harmadára csökkent, ami a megfelelő kontrollnak csupán 20%-át jelenti. A 14. napra további erőteljes csökkenést detektáltunk, de a relatív mennyiség itt is 20% volt, mivel a kontroll értéke is lecsökkent.

Bár az összmennyiség különbözött a +2 kontroll levelekben, az *Lhcb* gének mRNS-einek aránya ugyanazon értékhatások között mozgott, ahogyan a -2 levelekben mértük. Mindössze az *Lhcb1.4* és *Lhcb3* mRNS-ek esetében kaptunk egymástól szembetűnően különböző arányokat az egyes kontroll mintákban (v.ö. 33.A, C és E ábra).

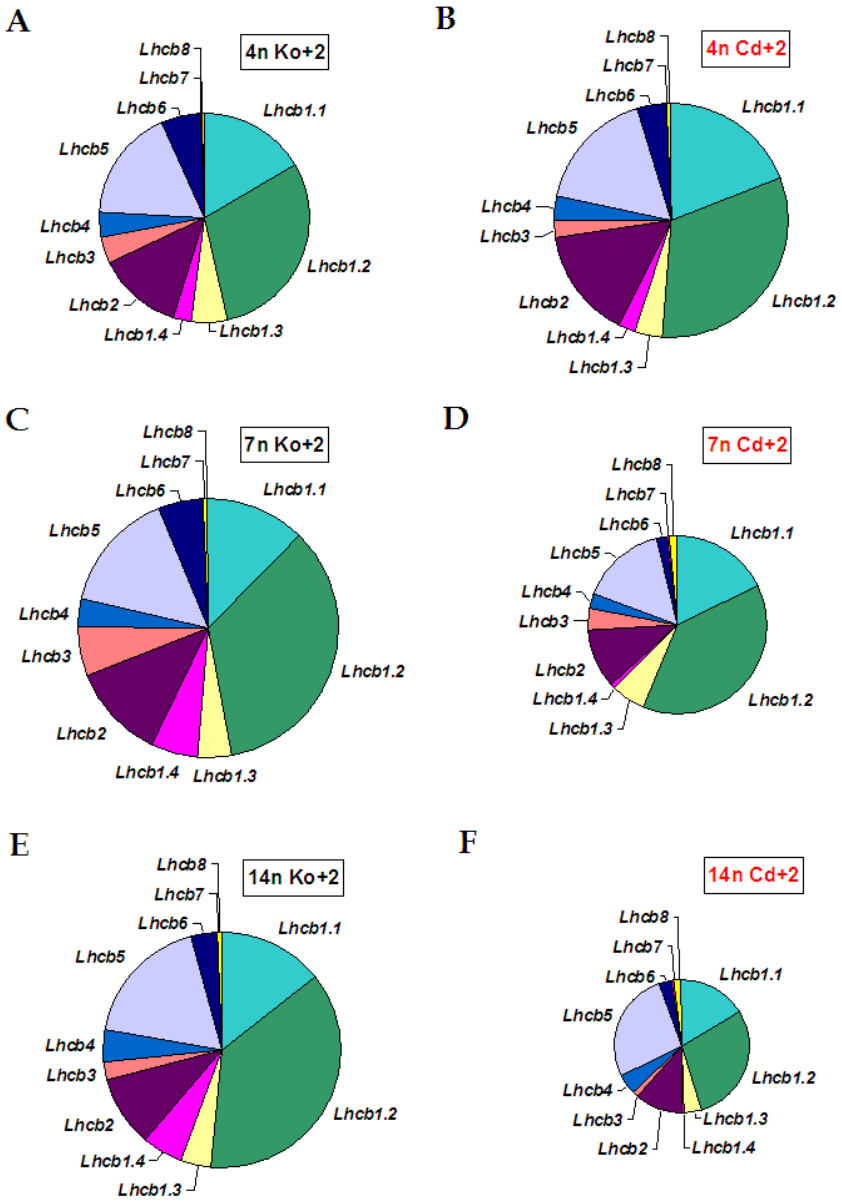


32. ábra: Az *Lhcb* gének mennyisége és kifejeződési aránya az alsó levelekben. Az *Lhcb* mRNS-ek összmennyisége a kör területével arányos. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

A Cd kezelés a 4. napos +2 levélben megemelte az *Lhcb* mRNS-ek mennyiségét, viszont nem módosította egymáshoz viszonyított arányukat (v.ö. 33.A és B ábra). A 7. napra azonban nemcsak az mRNS-ek summája csökkent jelentősen, hanem a gének kifejeződési arányában is látványos eltérés mutatkozott a kontrollhoz képest (v.ö. 33.C és D ábra). Megemelkedett az *Lhcb1.1-1.3* mRNS-ek relatív előfordulása, ezzel egyidejűleg jelentősen csökkent az *Lhcb1.4* hozzájárulása az összmennyiséghez, az *Lhcb3*, *Lhcb4* és

Lhcb6 mRNS-ek relatív mennyisége is csökkent. A 14. napra a további általános mRNS szint csökkenéshez a tagok egymás közti viszonyainak átrendeződése társult. A kontrollhoz képest 10%-al kevesebb volt az *Lhcb1.2* részesedése, az *Lhcb1.4* is csak 0.76%-ban volt jelen. Ugyanakkor 10%-al több volt az *Lhcb5* mRNS aránya, mint a vele egyidős kontrollban. Kisebb mértékű emelkedést mutatott az *Lhcb1.1*, *Lhcb2*, *Lhcb4* mRNS-ek aránya is.

Az mRNS-ek arányának megváltozása az *Lhcb* mRNS-ek összmennyiségének csökkenését kísérő jelenség. A kontrollhoz képest százalékosan magasabb arányban jelenlévő mRNS-ek kapcsán elmondható, hogy génjeik átíródását kevésbé érintette a Cd-kezelés. Azon gének, melyek transzkriptumainak aránya csökkenést mutatott, az átlagosnál érzékenyebben reagáltak a stresszre és feltételezhetően eltérő szabályozás alatt állnak.



33. ábra: Az *Lhcb* gének mennyisége és kifejeződési aránya a felső levelekben. Az *Lhcb* mRNS-ek összmennyisége a kör területével arányos. Ko – kontroll, Cd – Cd-kezelt

VI. Diszkusszió

Dolgozatomban a Cd-stressz következtében fellépő, a tilakoidmembránok összetételét és szerveződését érintő változások feltárását és ezek kiváltó okainak kutatását tűztem ki célul, különös tekintettel az antennaszerkezet változásában megnyilvánuló válaszfolyamatokra. A Cd-stressz tüneteit az irodalom részletesen tárgyalja (*Sanita di Toppi és Gabbrielli 1999*; *Benavides és mtsai, 2005; Bertrand és Poirier, 2005; Kučera és mtsai, 2008*), ugyanakkor az ezek hátterében álló pontos hatásmechanizmus nem ismert. Tudjuk, hogy a Cd közvetlen módon képes befolyásolni a génexpressziót (*Weber és mtsai, 2006; Yeh és mtsai, 2007*), valamint az SH-csoportokhoz való kötődése révén, zavarokat okozhat a fehérjék aktivitásában (*van Assche és Clijsters, 1990*). A Cd-stressz közvetett hatásai közül ki kell emelni a vasháztartásban okozott zavarok (*Hodoshima és mtsai, 2006; Clemens, 2006*) és a Cd-indukálta oxidatív stressz következményeit (*Smeets és mtsai, 2008*). Mi ezek közül, a fotoszintetikus apparátus kialakulását erősen befolyásoló Fe-hiányt és a génexpressziós változásokat vizsgáltuk. Kísérleti növényeink közül a cukorrépa Cd kezelésre és a vashiányra egyaránt érzékenyen reagált. Gyors növekedésének és nagy produktivitásának köszönhetően megfelelő alanynak bizonyult a tilakoid pigment-protein komplexek pigment-összetételének vizsgálatára. A Cd-stressznek jobban ellenálló nyárfa növényeknél viszont megfigyeltük, hogy a hosszú idejű Cd-kezeléskor számos élettani paraméterük helyreállást mutatott (*Solti, 2012)*. Ezért a nyárfa növények esetében az akut Cd-stressz hatásaiban a regeneráció szempontjából fontos változásokat vizsgáltuk. A nyárfa, mint fás szárú genetikai modellnövény alkalmas volt a perifériás antennákat alkotó, a stresszválaszban fontos szerepet betöltő, Lhc proteincsalád tagjainak transzkripciós szintű vizsgálatára is.

1. Az akut Cd stressz fajonként eltérő választ vált ki

A kísérleteinkhez választott növények nem reagáltak egyformán a tápoldathoz adagolt 10 µM Cd-ra. Ennek egyik fő oka lehet, hogy a cukorrépa növények sokkal több Cd-ot halmoztak fel a leveleikben, mint a nyárfa növények. A Cd-kezelt cukorrépa és nyárfa növények leveleiben hasonló mértékű, szignifikáns csökkenést mutattunk ki a PSII közvetlenül a sötétadaptáció után mért, maximális (F_v/F_m) és az aktinikus fényen *steady-state* állapotban mért, aktuális ($\Delta F/F_m'$) kvantumhatékonyságában is. A csökkent mértékű PSII hatékonyság egyik oka lehet, hogy a Cd közvetlenül a PSII-höz kötődve gátolja annak

működését (*Faller és mtsai, 2004; Sigfridsson és mtsai, 2004*). Közvetlenül gátolhatja azonban a Calvin-ciklus enzimeit is az SH-csoportokkal való kölcsönhatása révén (*van Assche és Clijsters, 1990*), ami szintén befolyásolja az elektrontranszportot. A szén-dioxid-fixáció gátlását azonban előidézheti a Cd-indukált vashiány is, aminek következtében a PSII aktivitása zavarokat szenved (*Belkhodja és mtsai, 1998*). Kimutatták ugyanis, hogy vashiány esetén csökken a ribulóz-5-foszfát kináz aktivitása (*Arulanantham és mtsai, 1990*), valamint a génexpresszió gátlásán keresztül a Rubisco mennyisége is (*Nováková és mtsai, 2004*). A tapasztaltakból következik, hogy a Cd-stressz fotoszintetikus aktivitásváltozással kapcsolatos tüneteinek előidézésében egyrészt a Cd közvetlen hatásainak, másrészt az általa előidézett vashiánynak is fontos szerep jut.

A fotoszintetikus aktivitás csökkenése következtében kialakuló fénystressz kivédésében általában fontos szerepet játszanak és erősödnek az antennákhoz köthető nem fotokémiai kioltó folyamatok (*Niyogi, 2000*). Ugyanakkor az akut Cd-stressz mindkét növénynél az NPQ jelentős csökkenését okozta. Az antennákhoz köthető védekező mechanizmus blokkolása a PSII antennák mennyiségének és szerveződésének megváltozására enged következtetni. Ez valószínűleg nem a Cd-indukált vashiánnyal függ össze, mert a vashiányos cukorrépa növényekben, ellentétben a Cd-kezeltekkel, az NPQ erőteljesen megemelkedett. Cd-kezelés hatására a kioltási mechanizmusok közül, a cukorrépától eltérően, a nyárfában az inaktív PSII centrumok általi kioltás (Φ_{NF}) jelentősen megemelkedett a PSII aktuális hatékonyságának (Φ_{PSII}) terhére (*Solti és mtsai, 2009*). Az intenzívebbé váló Φ_{NF} és a párhuzamosan lecsökkent Φ_{PSII} azt jelzi, hogy a sérült PSII egy része nem vett részt a regenerációs ciklusban, hanem inaktív kioltó centrumként működött (*Chow és mtsai, 2002; Hendrickson és mtsai, 2005*).

A Cd-kezelés és a csökkent fotoszintetikus aktivitás a fotoszintetikus apparátus kialakulását is befolyásolta az újonnan fejlődő levelekben. Ennek legszembetűnőbb jele a cukorrépa és nyárfa növényeknél egyaránt tapasztalt klorózis. A Cd-kezelés okozta Chl-tartalom csökkenésnek különböző okai lehetnek. A Cd képes közvetlenül gátolni a Chl bioszintézisben részt vevő enzimek működését, pl. az ALA-dehidratáz SH-csoportjához kötődve inaktiválja az enzimet (*Padmaja és mtsai, 1990*). Közvetve pedig, a redox állapot megváltoztatása révén, a protoklorofillid-oxidoreduktáz működését gátolja (*Böddi és mtsai, 1995*). A Chl-szintézis csökkenésének másik feltételezhető oka a biológiailag aktív vas csökkent elérhetősége Cd-kezelés hatására (*Siedlecka és Krupa, 1999*). A Chl-bioszintézis egyik kulcsenzime, a Mg-protoporfirin-IX-monometil-észter oxidatív cikláz működéséhez ugyanis Fe^{2+} ionokat igényel (*Spiller és mtsai, 1982*). Kimutatták továbbá azt is, hogy a

vashiány okozta génreguláció következtében csökkent az említett enzim szintézise (*Yang és mtsai, 2010*). A vashiány a Chl *b* szintézist is befolyásolja: a Chl *a* oxigenáz ugyanis tartalmaz egy Rieske-féle 2Fe-2S centrumot, és aktivitásához egy mononukleáris vasiont is igényel (*Tanaka és mtsai, 1998*). A Chl-tartalom csökkenéshez azonban hozzájárulhat az apoproteinek génexpressziójának gátlása is (*Herbette és mtsai, 2006*).

A Chl-tartalom csökkenéssel egyidejűleg megfigyelhető Chl *a/b* arány változás a komplexek relatív arányát érintő változásokra, azaz a fotoszintetikus apparátus átszerveződésére utal (*Sárvári, 2005, Timperio és mtsai, 2007*).

2. A tilakoidok összetételében és szerveződésében bekövetkező változások Cd-stressz, ill. vashiány hatására

A fotoszintetikus apparátus struktúráját és funkcióját jellemző általános paraméterek változása előrevetítette a pigment-protein komplexek szerveződésének megváltozását. A membránkötött protein-komplexek kölcsönhatásainak vizsgálatára legalkalmasabb módszer a BN-PAGE, melyet a 100-1000 kDa mérettartományba eső komplexek elválasztására dolgoztak ki *Schägger és von Jagow* (*1991*). A natív struktúra megőrzése céljából az elektroforézis során nem használnak detergenseket. Az elektromos térben való vándorlásukhoz szükséges töltést a mintához adott „Coomassie Blue" festék biztosítja. A membránok szolubilizálásához használt gyenge detergensek pedig főként a lipid-fehérje kölcsönhatásokat szüntetik meg anélkül, hogy a fehérjekomplexek natív struktúráját (protein-protein kölcsönhatásokat) megbontanák (*Reisinger és Eichacker, 2007*). A fotoszintetikus komplexek struktúráját érintő változásokat BN/SDS 2D PAGE-sel vizsgáltuk Cd-kezelt és vashiányos cukorrépa, valamint a Cd-kezelt nyárfa növényekben is.

A BN-PAGE módszerrel elválasztott hasonló mobilitású sávokban megjelenő Chl-tartalmú komplexek protein és pigment-összetétele kezelés hatására sem a cukorrépa sem a nyárfa növényeknél nem tért el a kontrollétól. Az 1. dimenziós géleken a cukorrépa és nyárfa tilakoidokban rendre 18 és 22 sávot mutattunk ki, ezek közül rendre 15 és 19 sávot tudtunk is azonosítani a protein-összetétel alapján. A megjelenő sávok számbeli különbségét az okozta, hogy a gélek felső régiójában található PSI és PSII szuperkomplexek nagyobb számban jelentek meg a nyárfa tilakoidokban. Az általunk használt gélrendszerben mindkét kísérleti növény esetében 3 különböző szerveződésű PSI komplexet, négy eltérő PSII-t találtunk. Továbbá, a cukorrépánál 2, a nyárfánál 3 eltérő,

antenna-komponensekből álló sávot jellemeztünk részletesebben a munka során. A PSI szuperkomplexek különbözhetnek egymástól a hozzájuk kapcsolódó LHCI és/vagy LHCII mennyiségében. Elképzelhető azonban az is, hogy ezek a sávok PSI aggregátumokat tartalmaznak, bár az ilyen komplexeket a magasabbrendű növények esetében műterméknek tartják (*Boekema és mtsai, 2001*). Az újabb kutatások tükrében azonban az a legvalószínűbb, hogy ezek a CEF-ben fontos szerepet betöltő PSI+NDH komplexek (*Peng és mtsai, 2009*). A PSI legnagyobb része azonban monomer formában volt jelen a géleken. A PSI *core* komplexek, amelyekről a minta előkészítése során leváltak az LHCI komplexek, csak kis mennyiségben voltak kimutathatók. A PSII szuperkomplex-sávokról a molekulatömegük (900-1300 kDa) alapján valószínűsíthető, hogy ezek dimernél nagyobb (oligomer) komplexek (*Dekker és Boekema, 2005*), amelyek a hozzájuk kapcsolódó LHCII trimerek és PSII kapcsoló antennák mennyiségében különbözhetnek. Cukorrépánál 300, nyárfánál pedig kb. 150-200 kDa eltérést mutattak tömegükben, ami megfelel egy vagy két LHCII trimer mulekulatömegének (kb. 155 kDa). A PSII monomer és a PSII-CP43 monomer vélhetően a PSII regenerációs ciklusának köztes elemeit képviselő szubkomplexek (*Andersson és Aro, 2001*), amelyekről levált a külső antenna illetve a belső antenna CP43 része is. A trimer LHCII és a kezelésektől függő kisebb-nagyobb mennyiségben megjelenő monomer Lhc-k mellett egy, a PSII kapcsoló antennáját is hordozó LHCII+CA sávot is kimutattunk a nyárfa tilakoidok esetében, ami a cukorrépában nem jelent meg. Ezek a különbségek az antennák eltérő szerveződésére vagy eltérő erősségű kapcsolódására utalhatnak, ami különböző védelmi mechanizmusok működésével lehet összefüggésben (*Ruban és mtsai, 2012*).

2.1. A pigment-protein komplexek szerveződésének Cd-stressz hatására bekövetkező változásaiért elsősorban a Cd-indukált vashiány felelős

A BN gélek analízisével kimutattuk, hogy cukorrépában a Cd-stressz és a vashiány is leginkább a PSI monomer, a PSII szuperkomplex és az LHCII trimer komplexek akkumulációját gátolta (10. ábra). A PSII és antennájának változásai kissé kifejezettebbek voltak az erős vashiány esetében, mint Cd-stressznél, ami az előbbiek nagyobb mértékű vashiányával lehet összefüggésben. Spenót növényekben vashiány hatására szintén a PSI és az LHCII mennyisége reagált a legérzékenyebben (*Timperio és mtsai, 2007*). Qureshi és mtsai. (*2010*) a Cd-kezelés és a vashiány hatásait vizsgálva mustár tilakoidokban a szuperorganizáció csökkenését és az LHCII/Lhc monomer arány csökkenését mutatták ki.

A PSI érzékenységét magas vastartalma indokolja. Ugyanakkor a szuperorganizáció és az antennák méretének csökkenése a fényabszorpciót redukálja, vagyis a stressz hatására kialakult fotoinhibíciót védi ki, ami megfelelő túlélési stratégiát képviselhet cukorrépában vashiány és/vagy nehézfém stressz körülmények között.

A Cd-kezelés és az extrém vashiány (-Fe*) által előidézett, az összes komplex felhalmozódásában bekövetkező nagymértékű csökkenés egy erősebb stressz kialakulását jelzi. Emiatt a növény már nem képes helyreállítani a fényfelesleg okozta károsodásokat, és a D1 protein lebontás/reszintézis egyensúlya a degradáció irányába tolódik el (*Geiken és mtsai, 1998*). A D1 protein degradációját a vízbontó rendszer 33 kDa-os egységének lebomlása is kísérte vashiányos szőlő növényekben, a teljes PSII mennyiségének csökkenését idézve elő (*Bertamini és mtsai, 2002*). Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, hogy amikor a működőképes PSII komplexek mennyisége a lebontás következtében minimálisra csökken, a D1 protein további degradációja, a reszintézisre való képesség hiányában, abbamarad (*Takahashi és Murata, 2008*). Enyhébb vashiány esetén viszont a CP43 nélküli PSII mennyisége (PSII-CP43) a kontrolléhoz hasonló szinten maradt, ugyanakkor aránya megemelkedett a PSII különböző formáit tekintve, miközben a PSII szuperkomplexek aránya lecsökkent (12. ábra). Ebből arra következtetünk, hogy az enyhébb vashiány hatására a PSII lebomlása és regenerációs ciklusa felgyorsult. *Brassica juncea* (indiai mustár) növényekben is a PSII lebomlásának egyik köztes állapotát képviselő un. PSII szubkomplexet mutattak ki, aminek a mennyisége Cd-kezelés valamint vashiány következtében is megemelkedett (*Qureshi és mtsai, 2010*), jelezve a nagyobb intenzitású lebontást/reszintézist.

A vashiányos növényeknél a védelemhez hozzájárult, hogy a teljes NPQ és annak az antennákhoz kötött xantofill-ciklus alapú kioltás (Φ_{NPQ}) része is jelentősen megemelkedett. Bár a BN-gélekből izolált komplexek Chl-ra vonatkoztatott karotinoid-összetétele nem változott meg a kezelések hatására, az extrém mértékben vashiányos levelekben (-Fe*) jelentős mennyiségű Zx felesleget mutattunk ki (16. ábra). Korábban végzett kísérletek vashiányos cukorrépából izolált tilakoidok cukorgrádiensen való elválasztása egy Zx-ban gazdag, az Lhc monomerek közelében lévő sávot eredményezett (*Abadía és mtsai, nem publikált adatok*). A BN géleken nem találtunk ennek megfelelő sávot, aminek egyik magyarázata lehet, hogy tilakoidokhoz kötődő pigmenteket a minta előkészítése, vagyis az enyhe szolubilizáció eltávolította. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy az akrilamid gélből történt bonyolult izolálási eljárás során veszítettük el a lazán kapcsolódó Zx-t. Ez ugyan kevésbé tűnik valószínűnek figyelembe

véve, hogy a stressz hatására felhalmozódó Zx egy jelentős része nem fehérje-kötött formában is megtalálható a tilakoidmembránban (*Dall'Osto és mtsai, 2010*). A lipidfázisban, részben a kloroplasztiszok burkolómembránjában jelenlévő Zx egyrészt a fényfelesleg hatására keletkező ROS eliminálását végzi (*Havaux és mtsai, 2007*), másrészt a membránlipidek stabilitásáért is felelősnek tartják stresszkörülmények között (*Gruszecki és mtsai, 2005*).

A Cd-kezelt és a –Fe* növényekben a pigmentet nem kötő komplexek szerveződése is jelentősen átalakult. Mutatja ezt a megemelkedett CF_1/CF_o+CF1 arány, valamint Cit b_6/f komplex monomer/dimer arányának emelkedése a +Cd és –Fe* növények tilakoidjaiban (14. ábra). Ezek a tények a PSI+NDH komplexekből álló PSI szuperkomplexek arányának emelkedésével együtt arra utalnak, hogy CEF intenzitása megnövekedett a stressz alatt.

A 2. dimenziós SDS géleken a fotoszintetikus elektrontranszport elemein kívül olyan fehérjék is kimutathatók voltak, amelyek a CO_2-fixációban vesznek részt. Korábbi kísérletekben igazolták, hogy a CO_2-fixáció enzimei a sztróma lamellákhoz kapcsoltan stabil multienzim komplexeket képezhetnek (*Süss és mtsai, 1993; Anderson és mtsai, 1996*). Az általunk vizsgált –Fe* tilakoidokban a Rubisco az FNR és a fruktóz-aldoláz enzim mennyiségének szignifikáns emelkedését tapasztaltuk. Ez ellentétben áll azzal a korábban kapott eredménnyel, hogy cukorrépában vashiány esetében a Rubisco mennyisége, a génexpresszió gátlásának köszönhetően, lecsökken (*Winder és Nishio, 1995*). Ezt az ellentmondást magyarázhatjuk azzal, hogy a –Fe* növényekben az enzimek nagyobb része kapcsolódik vagy szorosabban kötődik a tilakoid membránokhoz. Az is elképzelhető azonban, hogy a CO_2-fixáció enzimeinek mennyisége csak látszólag emelkedett meg, és valójában a pigment-protein komplexekhez képesti megváltozott arányukat detektáltuk. Vashiány hatására ugyanis csökken a kloroplasztiszokban található gránumok mennyisége, és az azokat felépítő tilakoidok száma is, a nem kapcsolt tilakoidok mennyisége pedig relatíve megnövekszik (*Spiller és Terry, 1980; Platt-Aloia és mtsai, 1983*). A hasonló gélrendszerben vizsgált vashiányos cukorrépa tilakoidokban korábban leírt, az aminosav-anyagcserében részt vevő enzimek jelenlétét (*Andaluz és mtsai, 2006*) nem tudtuk kimutatni az általunk készített preparátumokban.

A Cd-stressz és a vashiány tilakoidszerveződésre gyakorolt hasonló hatásai alapján feltételezhető, hogy a Cd-kezelt növények tilakoidjaiban tapasztalt változások nagy része a nehézfém által indukált erőteljes vashiánnyal függ össze. Erre utaltak korábbi nyárfán végzett vizsgálataink is, ahol a vashiány szintén a Cd-kezeléshez hasonló tüneteket okozott, illetve a tápoldatba adagolt többlet vas hatására a fotoszintetikus paraméterek

helyreállását mutattuk ki (*Solti, 2012*). A Cd-indukált vashiány kialakulásában egyaránt szerepet játszhat a gyökér vasfelvételének (*Alcántara et al., 1994*), a vas a hajtásba történő transzlokációjának (*Fodor és mtsai, 2005*) és a kloroplasztiszokba való bejutásának gátlása (*Sárvári és mtsai, 2011*). Ugyanakkor a Cd-kezelt cukorrépa levelek vastartalma nem tért el oly mértékben a kontroll mintákétól, mint a valóban vashiányos leveleké (2. táblázat). Úgy tűnik tehát, hogy bár a vas egy része feljutott a levelekbe, a tilakoidokba nem volt képes beépülni, vagyis az általunk tapasztalt változások hátterében a kloroplasztiszban fellépő lokális vashiány állhat. A Cd megzavarhatja a mezofillumsejtek és/vagy a kloroplasztiszok vasfelvételét. A gátlás elsődleges célpontja a mezofillumsejtek plazmamembránjában, ill. a kloroplasztiszok burkolómembránjában található Fe(III)-kelát reduktáz enzim (*Larbi és mtsai, 2002*; *Jeong és mtsai, 2009*), a Cd rájuk gyakorolt hatásáról azonban való nincsenek irodalmi adatok.

Bár a tilakoidok szerveződésében az erős vashiány és a Cd jelenléte hasonló változásokat indukált, az aktivitási paraméterek értékei némileg különböztek egymástól, azaz a fotoszintetikus aktivitás változásaihoz Cd-stressz esetén a Cd közvetlen hatásai is hozzájárulhattak. Vashiány esetén az antennákhoz kötött kioltás emelkedését, és az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó Zx jelentős mértékű felhalmozódását is tapasztaltuk. Ezzel szemben a Cd-kezelés hatására csökkent az antenna eredetű nem-fotokémai kioltás, és inkább az inaktív reakciócentrumokhoz kötődő kioltás (Φ_{NF}) került előtérbe. Ugyanakkor mindkét stresszor olyan akklimatizációs változásokat indukált a tilakoidok szerveződésében, aminek következtében csökkent a fényabszorpció (az antennák akkumulációjának csökkenése) és emelkedett a fotokémiai kioltás, vagyis a CEF intenzitása.

2.2. A pigment-proteinek átszerveződésére akut Cd-stressz alatt előfeltétele a későbbi regenerációnak

A Cd-kezelt nyárfa növényeknél a stressz folyamán fejlődő felső levelekben kimutatott csökkent Chl *a/b* arány az antenna komponensek relatív túlsúlyából ered, szemben a cukorrépa esetében tapasztalt megemelkedett *core*-komplex/antenna aránnyal. Az akut Cd stressz leginkább a PSI monomerek mennyiségét csökkentette, ugyanakkor az LHCII antennát tartalmazó komplexek (PSII szuperkomplex, PSII dimer, LHCII-CA, LHCII trimer és monomer Lhc) akkumulációját ennél kevésbé gátolta (19. ábra). A kezelés hatására a azonban PSII aktivitása sokkal inkább csökkent, mint a PSI-é *(Siedlecka és*

Baszynski, 1993). Az LHCII egy része a PSI-hez kapcsolódhatott, amit a zöld géleken korábban már sikerült kimutatni Cd kezelt nyárfa növényekben *(Sárvári, 2005)*. Ezt támasztja alá az is, hogy a *Brassica juncea* esetében kimutatták a PSI komplexben az LHCII kötéséért felelős, PsaH fehérje génexpressziójának fokozódását Cd hatására (*Fusco és mtsai*, *2005*). Az un. mobil LHCII komplexek feladata az abszorbeált energia megfelelő eloszlásának biztosítása a két PS között, aminek következtében megváltozik a komplexek szerveződése (*Kargul és Barber, 2008*). A Cd10-es növények felső leveleiben a PSI szuperkomplexek mennyiségének jelentős emelkedését is tapasztaltuk, ami a CEF előtérbe kerülésére utalhat (*Peng és mtsai, 2009*).

A PSII turnover-re utaló CP43 nélküli PSII monomerek relatív mennyisége jelentősen lecsökkent akut Cd stressz alatt, ezzel egyidejűleg a PSII szuperkomplexek aránya megemelkedett (20.C. ábra). Vagyis a PSII nem bomlott le, hanem és az antennák egy jelentős részével együtt energiadisszipáló szuperkomplexekbe szerveződött (*Patsikka és mtsai, 2002*), amit a jelentősen megemelkedett arányú Φ_{NF} paraméter is jelzett. A fenti változások a nyárfa nagyobb stressztűrő képességét bizonyítják a cukorrépához viszonyítva, hiszen a Cd-kezelés a cukorrépa tilakoidokban az antenna lebomlását és ezzel egyidejűleg a PSII degradációját idézte el. Eredményeink alapján a PSI és PSII szuperkomplex formáknak jelentős szerepe lehet az akklimatizációs folyamatokban, ahogy azt már kimutatták a magas fényintenzitásra érzékeny *Arabidopsis* mutánsokban is (*Takabayashi és mtsai, 2012*)

Az Lhc monomerek arányának növekedése a trimerekkel szemben szintén kimutatható volt a Cd10-es felső nyárfalevelekben (20.B. ábra), sokkal kifejezettebb mértékben, mint a cukorrépánál. A trimerizáció a normál működés szempontjából annyira fontos sajátossága az LHCII antennának, hogy Lhcb1 és Lhcb2 hiányos *Arabidopsis* mutánsban a trimerek a CP26 (Lhcb5) antennából szerveződtek (*Ruban és mtsai, 2006*). A trimerek formálódása valószínűleg a veszteség nélküli, hatékony energiatranszfert biztosítja a reakciócentrumok felé. A kisebb hatékonyságú fénygyűjtő antenna az e^- transzportlánc gátlásának következtében kialakult fényfelesleget csökkenti, ezáltal előzi meg a káros mennyiségű ROS képződését. Cd-kezelés esetében azonban egyéb okok is hozzájárulhatnak a trimerizáció csökkenéséhez. Például egyes, a trimerizációban fontos szerepet játszó Lhcb fehérjék transzkripciójának csökkenése (*Tziveleka és mtsai, 1999; Fagioni és mtsai, 2009*) és/vagy az LHCII oligomerizációjához feltétlenül szükséges foszfatidil-glicerol szintézisének gátlása *(Krupa, 1988*) is okozhatja.

A mérsékelt Cd-stressz jellegzetes tünetei 7-10 napos Cd-kezelés után voltak a legkifejezettebbek. Ezt az időszakot a Cd-kezelés fenntartása mellett is lassú helyreállás követte a nyárfa növényeknél. A Chl *a/b* arány visszaállt a kontrollra jellemző értékre, a fotoszintetikus aktivitás is helyreállt, és a nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok közül is, a kontroll növényekhez hasonlóan, az xantofill-cikluson alapuló kioltás került előtérbe (8. táblázat). A turnover-ben részt vevő CP43 nélküli PSII komplex mennyisége megközelítette a kontroll szintet, amivel párhuzamosan a valószínűleg sérült komplexeket is tartalmazó, PSII szuperkomplexek lebontása volt megfigyelhető (19. ábra). A vaskoncentráció szinte alig változott a levélben, ellenben megváltozott a vas sejten belüli megoszlása: megemelkedett a kloroplasztiszok vastartalma (*Solti, 2012*). A regenerációnak a kloroplasztisz vastartalom emelkedésével való összefüggésére utal az a megfigyelés is, hogy a Cd-kezeléssel egyidejűleg adagolt többlet vasnak köszönhetően nem jelentek meg a Cd-stressz tünetei, a nyárfa kloroplasztiszok vastartalma megemelkedett miközben a leveleké a többlet vas nélkül nevelt Cd-kezelt növényekéhez hasonló volt (*Sárvári és mtsai, 2011*).

Összefoglalva, az akut Cd-stressz cukorrépában a szuperorganizáció csökkenését és az antenna leépülését okozta, ezzel csökkentve a fényabszorpció mértékét. A fotoinhibíció és a PSII irreverzibilis degradációja azonban még így is bekövetkezett, jelezve, hogy a növény védekezési folyamatai nem voltak eléggé hatékonyak. Ezzel ellentétben, nyárfában a stressz hatására olyan védekező válasz alakul ki, amelyben a szuperorganizáció és az antennák nagy része megmarad. Az NPQ egy jelentős hányada az inaktív PSII centrumoknak tulajdonítható, amelyek védik a még működőképes PSII-ket. Az LHCII antenna egy része viszont feltehetően a PSI-hez kötődik és a ciklikus elektrontransztportot segíti, ami működése és energiatermelése révén hozzájárulhat az oxidatív stressz csökkentéséhez és a károsodott komponensek regenerációjához. Ugyanakkor, csökken a PSII fényterhelése is, ami szintén redukálja a káros folyamatokat. Ezen változásoknak köszönhetően a nyárfa képes megőrizni a PS-k intaktságát és olyan mértékben fenntartani a funkciót, hogy a stressz későbbi szakaszában a kontrollhoz hasonló tilakoidszerveződés helyreállhasson. A fotoszintetikus apparátus kifejlődését a Cd stressz által indukált vashiány gátolja leginkább, a helyreállás pedig a kloroplasztisz vastartalom emelkedésével van összefüggésben.

2.3. Az akut Cd-stressz változásokat idéz elő az Lhca és Lhcb izoformák megjelenésében

A BN-PAGE-sel izolált tilakoid komplexek antenna komponenseinek további 2D gélelektroforézissel (IEF/SDS-PAGE) történő vizsgálata során a Cd-kezelés hatására bekövetkező minőségi és mennyiségi változásokat is kimutattunk. Apoprotein-összetételüket tekintve leginkább a trimer LHCII és a PSII oligomer komplexek különböztek a kontrolltól (23. ábra). A változások összhangban állnak a fentiekben részletezett makromolekuláris struktúra és a funkció átalakulásával. Továbbá feltételezzük, hogy az LHCII Cd-stressz indukálta monomerizációja összefüggésben áll az új Lhcb1,2 izoformák megjelenésével, melynek konformációja kevésbé kedvez a trimerizációnak. Eredményeink alapján az inaktív, energiadisszipáló oligomer PSII komplexek szerveződése és működése szempontjából szintén fontosnak tűnik az Lhcb1,2 izomerek minősége. Az antennaszerkezet átalakulásában egyaránt szerepet játszhatnak transzkripciós, transzlációs és poszt-transzlációs szintű regulációs folyamatok (*Pfannschmidt, 2003*). Bár a jelátviteli út egyes elemeit folyamatosan fedezik fel a génexpresszión alapuló kísérletekben (*Weber és mtsai, 2006; Yeh és mtsai, 2007*), de a tényleges regulációs folyamatokról még mindig csak szórványos információ áll rendelkezésre, különösen a nehézfém/Cd-stressz esetében. A nyárfa nukleinsav adatbázis szabad hozzáférhetősége lehetőséget biztosított az *Lhc* géncsalád transzkripciós szabályozásának vizsgálatára.

3. Az *Lhc* géncsalád transzkripciójának szabályozása nyárfában

A Cd-stressz hatására bekövetkező transzkripciós szintű változások követéséhez a nagy érzékenységű és specifikus qRT-PCR módszert választottuk. Ahhoz, hogy a mérés során kapott adatok biológiai értelmet nyerjenek megfelelő ún. normalizációs stratégiát kellett választanunk. Az irodalomban leginkább elterjedt, relatív mérésen alapuló módszer a belső kontroll gén(ek) használata. Ez a módszer magában hordoz egy előfeltételt, a mérés megbízhatóságához szükséges ugyanis, hogy a kiválasztott belső kontroll gén(ek) expressziója változatlan szintű legyen, függetlenül a fejlődési állapottól és a külső körülményektől. Az irodalmi adatok alapján kiválasztott belső kontrollok azonban nem bizonyultak elég stabilnak a Cd-kezelt nyárfákból származó mintákban (*Basa és mtsai, 2009*), ezért egy alternatív normalizációs stratégiát dolgoztunk ki. A mintában található összes mRNS mennyiségének mérésén alapuló ún. RiboGreen módszerre alapozva az *Lhc*

gének transzkripciós szintjét az adott mintában jelenlévő összes gén transzkripciójához képest tudtuk megadni. Ez a relatív meghatározás szintén lehetővé tette az egyes gének egymáshoz képesti kifejeződésének felderítését.

Az első ismert szekvenciájú növényi genom az *Arabidopsis thaliana* volt, amelynek annotációja vezetett ahhoz a felfedezéshez, hogy rendkívül sok esetben több gén kódolja ugyanazon fehérje eltérő izoformáit (*The Arabidopsis Genome Initiative, 2000*). A növények evolúciója során általánosnak számít a teljes genom megkétszereződése, amely leginkább felelős e nagy számban előforduló genetikai redundanciáért (*Langham és mtsai, 2004; Maere és mtsai, 2005*). Az újonnan keletkező gén előnyös mutációknak köszönhetően új funkcióra szelektálódhat, vagy az ősi és a megkétszereződött gén egyaránt megváltoztathatja korábban betöltött szerepét. A legtöbb mutáció azonban nem a fehérjét kódoló, hanem a regulációért felelős szekvencia részeket érinti (*Blanc és Wolfe, 2004; Casneuf és mtsai, 2006*). A géncsaládok a diverzifikáció következtében elkülönülő egyes tagjai egy sor egyedi funkcióra tehetnek szert, ezáltal nagyobb alkalmazkodóképességet nyújtva a növényi sejteknek. A géncsalád egyes tagjai kooperálva multiprotein komplexeket képezhetnek, ami további finom szabályozást enged meg a sejten belül. Ilyen dimer és trimer formációkat alkotnak egymással az *Lhc* géncsalád által kódolt fehérjék (*Jansson és mtsai, 1994; Ben-Shem és mtsai, 2003; Lucinski és mtsai, 2006*). Az ilyen interakciók megvalósulásához azonban elengedhetetlen feltétel az egyes tagok szinkronizált expressziója.

A nyárfa genomjában egyes Lhc fehérjéket egyetlen gén kódol, ugyanakkor több Lhc-t is kettő, ami esetükben valószínűsíti két eltérő fehérje izoforma képződését (*Klimmek és mtsai, 2006*). Az *Lhca1* mRNS-ekről a kvantitatív Real-Time PCR vizsgálatok kiértékelése során kiderült, hogy igen nagy különbség van a két *Lhca1* gén kifejeződésében. A két gén mRNS-einek mennyisége együtt 2 nagyságrenddel magasabb volt, mint az *Lhca1.2* génről átíródó mRNS-ek mennyisége (24. ábra). A mindkét gén termékét kimutató primerpárral mért változások tulajdonképpen az *Lhca1.1* gén átíródásában bekövetkező változásokat reprezentálják. Hasonló arányt kaptunk az *Lhcb4.1* és *Lhcb4.2* génekről átíródó mRNS-ekre is. A közös reakció az *Lhcb4.2* változásait mutatta, mivel az *Lhcb4.1* nagyságrendekkel alacsonyabb szinten fejeződött ki (30. ábra). Az *Lhca2*-t vizsgáló közös reakcióhoz képest az *Lhca2.1* mRNS szintje 25-30%-ban tért el, tehát az *Lhca2.2* gén terméke relatíve kis mennyiségben reprezentált, de ugyanazon nagyságrendbe esik. Az *Lhcb2.1* és *Lhcb2.2* génekről szintetizálódott mRNS-ek vizsgálata során a közös reakcióban 3-4-szer nagyobb értékeket kaptunk az *Lhcb2.2* génre elvégzett

specifikus PCR során (29. ábra). Ehhez hasonlóan az *Lhcb6.1* és *Lhcb6.2* gének kifejeződésének mértékében is kis eltérést kaptunk. Így az elvégzett reakciókból következtetni tudtunk egyrészt az *Lhca2.2*, *Lhcb2.1* és az *Lhcb6.1* mRNS-ek szintjének változásaira a növény fejlődése, ill. Cd-kezelése során. Az Lhcb3 fehérje kódja két rendkívül hasonló szekvenciájú DNS szakasz, ezért megkülönböztetésükre nem sikerült megfelelően specifikus primereket tervezni. Az Lhc család egyetlen tagja az Lhcb1, amelynek valószínűsített izoformáit 4 eltérő gén kódolja, *Lhcb1.1*, *Lhcb1.2*, *Lhcb1.3* és *Lhcb1.4*. Mind a négy gén transzkripciós szintjét külön-külön reakcióban tudtuk vizsgálni.

3.1. A levél fejlődési állapota befolyásolja az *Lhc* gének transzkripcióját

A kontroll mintákban tapasztalt transzkripciós mintázat alapján az *Lhc*-géneket 3 eltérő szabályozású csoportra bonthatjuk. Az első csoportra jellemző, hogy az alsó levélmintákban és a felső 4 napos fiatal mintában is hasonló volt az mRNS-ek mennyisége. A felső 7 napos mintában azután egy kiemelkedően magas transzkripciós szintet mértünk, amely a 14. napra rendszerint lecsökkent, sok esetben visszaállt a korábbi értékre. Ebbe a csoportba sorolhatóak az *Lhca1-4* gének, kivéve az *Lhca1.2*, valamint az *Lhcb*-k nagy része. A második csoportra jellemző, hogy a fiatal, 4 napos felső levél transzkripciós szintje minden többi kontroll mintáénál alacsonyabb. Ide sorolhatóak az *Lhcb1.4*, *Lhcb2.2* és az *Lhcb7* gének. A levél fejlődése alatt hasonló szabályozást mutató *Lhca5* és *Lhca6* gének alkotják a harmadik csoportot. Ezek mRNS szintje a fiatal fejlődő 4 és 7 napos levélben volt a legmagasabb, a többi kontroll levélmintában lényegesen alacsonyabbat mértünk. Egyedülálló transzkripciós mintázatot kaptunk az *Lhca1.2* és *Lhcb8* gének esetében, melyek egyik fentebb említett csoportba sem sorolhatók. Ugyanakkor mindkét vizsgált gén esetében kimutatható egy transzkripciós maximum a felső, 7 napos levélben, ami jól látszik az *Lhc*-k összesített mRNS mennyiségeit megvizsgálva is (27.C ábra, 33.C ábra). Ez magyarázható azzal a ténnyel, hogy a levelek ekkorra érik el kifejlett méretüket és fotoszintetikus aktivitásuk maximumát is, ami megköveteli a fénygyűjtő antennák méretének növekedését is (*Battchikova és Aro, 2008*).

3.2. Az *Lhc* gének nagy része közös transzkripciós szabályozás alatt áll

A Cd-kezelt növények leveleinek transzkripciós mintázata alapján az Lhca1-4 és az Lhcb1-6 fehérjéket kódoló géneket egy csoportba sorolhatjuk. Az alsó levelekben sok esetben mutattunk ki a kontrollhoz képest 20-30%-os mRNS szint csökkenést. Ez nem

meglepő figyelembe véve, hogy a kezelés 10. napjára az alsó levelek Chl-tartalma is lényegesen lecsökkent. A fotoszintetikus aktivitás és a legtöbb tilakoid-komplex mennyisége is alacsonyabb volt a kontrollnál, bár az antennák mennyisége relatíve kisebb mértékben csökkent. A 4 napos fejlődésben levő, kisméretű levélben mért transzkripció mértéke Cd hatására vagy nem tért el az azonos korú kontroll mintáétól, vagy annál szignifikánsan magasabb értéket adott. Ez magyarázható azzal, hogy ilyenkor még a levélben alacsony a Cd koncentrációja, ami a tapasztalat szerint induktív hatású is lehet (*Nyitrai és mtsai, 2003*). A 7. napon tapasztalt általános és igen nagymértékű mRNS szint csökkenés összhangban van azzal a ténnyel, hogy a Cd-kezelt felső levelekben a Chl-tartalom, így a pigment-fehérje komplexek mennyisége is ekkorra jelentősen lecsökkent, az akut Cd-stressz szimptómái maximumot értek el. A fentiek alapján az Lhca1-4 és Lhcb1-6 fehérjéket kódoló gének közös szabályozását valószínűsítjük, bár tapasztaltunk kisebb eltéréseket az egyes izoformák kifejeződésében.

A 2D IEF/SDS módszerrel feltárt antennaösszetétel az Lhcb1 és Lhcb2 egyes izoformáinak mennyiségében emelkedést mutatott a Cd-kezelt mintákban, ezzel párhuzamosan az Lhcb3 bizonyos izoformáinak mennyisége jelentősen lecsökkent (23. ábra). A transzkripciós szintű változások is azt mutatták, hogy az Lhcb1 és Lhcb2 fehérjék nagy mennyiségben expresszálódó izoformáit kódoló gének kevésbé érzékenyek a Cd-kezelésre, mint az Lhcb3 fehérjét kódoló gén. A kezelés elején a felső levelekben közülük több is serkentést mutatott. Ezzel ellentétben a magas fényintenzitásnak kitett spenót levelek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy legérzékenyebben az Lhcb1 reagált a stresszre, ezt követte az Lhcb2 mennyiségének csökkenése. Ugyanakkor az Lhcb3 mennyisége csak az Lhcb1 és Lhcb2 teljes kimerülését követően csökkent le (*Timperio és mtsai, 2012*). Az Lhcb3 összekötő funkciót tölt be a nagy LHCII antenna és a PII között (*Galetskiy és mtsai, 2008*), és feltételezhetően csak az antenna degradációját követően válik célponttá. Saito és mtsai (*2010*) viszont vashiány hatására speciális Lhcb1 izoformák felhalmozódását figyelték meg árpában, amelynek fényvédő szerepe lehet, mert a mutánsok erősen fényérzékenyek voltak. A nyárfában tapasztalt akklimatizációs folyamatokban fontos szerepet játszhatnak az Lhcb1 és Lhcb2 fehérjék olyan szempontból is, hogy a mobilis LHCII komponenseiként leválnak a működő PSII-ről és más komplexek alkotóelemeként fordulnak elő. Így például megnövelhetik a PSI+NDH komplexek fénygyűjtési hatékonyágát is. Ugyanakkor tudjuk, hogy a PSII-ről leváló mobil LHCII nem tartalmaz Lhcb3-at. Elképzelhető, hogy a fénydisszipáló centrumként működő PSII

oligomerekben sem szükséges az Lhcb3 jelenléte, ennek bizonyításához azonban a szuperkomplexekben kimutatott Lhcb foltok azonosítása szükséges.

Az akklimatizációban alapvető szerepet tulajdonítanak az Lhcb1 izoformák előfordulásának a stressz hatására átrendeződő antennában (*Timperio és mtsai, 2012; Saito és mtsai, 2010*). Nyárfa növényekben a legnagyobb mértékben kifejeződő *Lhcb1.1* és *Lhcb1.2* gének az akut Cd-stressz alatt is megőrizték magas arányukat (33.C ábra), bár az összes *Lhcb* mRNS mennyisége jelentősen lecsökkent. Náluk lényegesen érzékenyebbnek bizonyult a jóval kisebb mennyiségben jelen lévő *Lhcb1.4*, melynek mRNS-ei a stressz akut fázisában szinte teljesen eltűntek. A különböző növényekből izolált Lhcb1 izoformák korábbi vizsgálata felhívta a figyelmet a fehérjék N-terminális régiójának eltérő hidrofobicitására (*Huber és mtsai, 2001*), aminek feltétezhetően szerepe van a különböző izoformák egymás közötti interakciójában, és az általuk képzett aggregátumok stabilitásában. Valószínűsítjük, hogy a nagy érzékenységet mutató Lhcb1.4 izoforma jelenléte megakadályozhatja az akklimatizációhoz szükséges szerkezeti átalakulásokat az antennában és ezért expressziója lecsökken. Ezzel egyidejűleg kimutatható volt az LHCII monomerizációja is a Cd stressz akut fázisában. A vashiányos árpa Lhcb1 génjeinek vizsgálatakor is párhuzamot fedeztek fel az izoformák eltérő transzkripciós szabályozása és a komplex monomerizációja között (*Saito és mtsai, 2010*). Azt is kimutatták, hogy az Lhcb1 fehérje monomer formáinak aránya megemelkedett vashiányos tilakoidokban. Az Lhcb1 izoformák eltérő transzkripciós szabályozását stressz körülmények között már korábban is leírták (*Caffari és mtsai, 2005*), ami vélhetően az energiadisszipáló antenna szerveződésének egyik kulcsfontosságú lépése a magasabbrendű növényekben.

Az *in silico* transzkripció analízis alapján az Lhca1-4 és Lhcb1-6 fehérjéket a nagymértékben kifejeződő csoportba sorolták, szemben az adatbázisokban igen alacsony számban jelen lévő Lhca5, Lhca6, Lhcb7 és Lhcb8 mRNS-ekkel (*Klimmek és mtsai, 2006*). Ez utóbbi elemeket az un. „minor Lhc" jelzővel illették, utalva alacsony kifejeződésükre és eltérő szabályozásukra. A jelen munkában kapott eredmények alapján azonban az *Lhca5*, *Lhca6* és *Lhcb8* gének transzkripciós aktivitása összevethető mértékű volt a többi *Lhc* génével. Ezt megerősítik az *Arabidopsis* növényekkel végzett az Lhc-k transzkripcióját vizsgáló mRNS hibridizációs kísérlet eredményei is (*Sawchuk és mtsai, 2008*). Méréseink alapján az Lhca1.2 és Lhca4.1 izoformák és az Lhcb7 mRNS-ei valóban nagyságrendekkel kisebb mennyiségben reprezentáltak a többi Lhc-hez képest és szabályozásuk is tőlük függetlennek tűnik. Az *Lhca1.2* és *Lhca4.1* gének transzkripciós szabályozása reagált legérzékenyebben a Cd-stresszre, bár a fehérje izoformák pontos funkciója egyelőre

ismeretlen. Nem tartjuk valószínűnek, hogy a stresszválaszban jelentős szerepük lenne. Eredményeink megerősítik azonban az Lhca5, Lhca6, Lhcb7 és Lhcb8 fehérjéknek a stressz folyamán betöltött védő szerepét, mivel Cd-stresszre kevésbé érzékenynek bizonyultak, egyes Cd-kezelt mintákban pedig kifejezetten növekedett transzkripciójuk.

3.3. Egyes Lhc fehérjéknek kiemelkedő szerepe van a stresszválaszban

Az *Lhca5* és *Lhca6* gének kifejeződését vizsgálva, Cd-stressz hatására a kezelés kezdetén, az alsó 2 napos levélmintákban magasabb transzkripciót mértünk, mint a kontrollban (25. ábra). A stressz legintenzívebb fázisában, a felső levelekben ugyan jelentősen csökkent az mRNS szint, de a 14. napon már a kontrollnak megfelelő értéket mutattak. Meg kell jegyezzük azonban, hogy a két gén termékének mennyisége a kontroll levelekben a 14. napon is igen alacsony volt.

Az Lhca5 fehérjéről bebizonyították, hogy sztöchiometrikus arányban van jelen a PSI-ben (*Storf és mtsai, 2004; Lucinski és mtsai, 2006*). Kimutatták azt is, hogy mRNS-ének mennyisége fény stressz esetén megemelkedik (*Ganeteg és mtsai, 2004*). Újabb kutatások igazolták, hogy az Lhca6 fehérjével együtt, a ciklikus elektrontranszportban részt vevő NDH komplexnek a PSI-hez való asszociációjában fontos szerepet játszanak (*Peng és mtsai, 2009*). Ez megmagyarázza a két gén hasonló kifejeződését mind a kontroll, mind a Cd-kezelt levelekben. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy regulációjuk eltér a többi konvencionális *Lhca* géntől.

Az Lhcb7 mRNS szintje Cd-stressz hatására kísérletünk minden mintájában megemelkedett (31. ábra). *Sawchuk és mtsai. (2008*) az Lhcb7 gén transzkriptumainak jelenlétét csak a fénynek leginkább kitett, oszlopos parenchima sejtekben tudták detektálni. Ezek alapján feltételezhetően szerepe lehet a többlet fénnyel szembeni védelemben, bár jelenlétét a PSII-ben még nem bizonyították. A nukleinsav szekvenciából következtetett fehérje szerkezete alapján az Lhcb5-höz áll legközelebb (*Klimmek és mtsai, 2006*).

Az általunk mért mRNS mennyiségek alapján az Lhcb8 is elkülönül a többi Lhc-től. Cd-stressz hatására két eltérő fejlettségű levélmintában emelkedett meg a transzkripciója (31. ábra), ami alapján arra következtetünk, hogy a levél fejlődési állapota a többi Lhc-től eltérően szabályozza transzkripcióját és a stresszre is tőlük eltérően reagál. Ezt erősítik meg az *in silico* analízis eredményei is (*Klimmek és mtsai, 2006*).

A fentiek alapján valószínűsítjük, hogy az *Lhca5*, *Lhca6*, *Lhcb7* és *Lhcb8* gének kódolta fehérjéknek fontos szerepe lehet a stressz kivédésében. Ma már tudjuk, hogy a

ciklikus elektrontranszport elengedhetetlenül szükséges a normális fotoszintetikus működéshez (*Peng és mtsai, 2009*). Az Lhca5 és Lhca6 fehérjék átírásában szerepet játszó mRNS-ek szintje enyhe Cd-stressz alatt megemelkedett, továbbá a stressz kései fázisában, a helyreállás kezdetekor a kontrollnak megfelelő transzkripciót mértünk. Ezzel összevetve a tilakoid szerveződésben tapasztalt változásokat, feltételezzük, hogy a ciklikus elektrontranszportnak fontos szerepe jut a Cd által kiváltott stresszválaszban.

A tilakoid komplexek Lhc fehérje-összetételének vizsgálata és a génexpressziós eredmények alapján valószínűsítjük, hogy az Lhc fehérjék mennyiségének Cd-stressz alatt megfigyelt változása legfőképp a transzkripciójuk szabályozásán keresztül valósul meg. Bár egyes vizsgálatok az Lhck-k regulációjában a poszt-transzkipciós szintű folyamatok (mRNS stabilitás, transzláció) elsődlegességére utalnak (*Frigerio és mtsai, 2007*). Az is bizonyított tény, hogy és az Lhc-k igen sokrétű poszt-transzlációs módosításon is átesnek (*Thompson és White, 1991, Pfannschmidt és mtsai, 2003*). Vizsgálataink során Cd-stressz hatására az mRNS-ek mennyiség és megfelelő fehérje komponensek hasonló mértékű csökkenését tapasztalunk, és csak kisebb mértékű eltéréseket mutattunk ki az izoformák közt az IEF/SDS kétdimenziós gélelektroforézis rendszerben. Ezen változásokról egyelőre nem tudjuk, hogy a transzkripció, vagy egyéb folyamatok által szabályozottak. Ehhez az Lhc fehérjefoltok pontos azonosítására lenne szükség. Az irodalmi adatok is megerősítik a transzkripciós szabályozás elsődlegességét az Lhc fehérjék szintézisében (*Tziveleka és mtsai, 1999*; *Schmid és mtsai, 2005; Winter és mtsai, 2007; Sawchuk és mtsai, 2008; Leister és mtsai, 2011)*. Ezt támasztja alá több korábbi kísérlet eredménye is, miszerint kimutatták például, hogy a membránokban lévő PQ-pool redoxállapota képes befolyásolni mind a kloroplasztisz gének, mind a magban kódolt fotoszintézis gének expresszióját. Escoubas és mtsai (*1995*) felállítottak egy modellt a PQ-pool és az *Lhcb* gének repressziója között folyó intracelluláris jelátviteli útvonalra. A modell szerint a redukált PQ-pool indukálja egy a kloroplasztiszban jelen lévő foszfoprotein (CPP) foszforilációját, ami kijutva a citoszolba egy proteinkinázt aktivál, amely az *Lhc* géneket szabályozó transzkripciós faktort foszforilálja. A plasztiszból a sejtmagba irányuló jel továbbításában részt vevő molekulák közül ki kell emelnünk a ROS szerepét, mivel ezek a Cd-stressz hatására is közvetve generálódó gyökök, így részt vehetnek a Cd-hatás által megnyilvánuló génexpresszió szabályozásban (*Smeets és mtsai, 2008*). *Chlorella vulgaris*-ban kimutatták, hogy a ROS akkumulációja negatív korrelációban áll az Lhcb fehérjék előfordulásával (*Wilson és mtsai, 2003*). Az *Lhcb* gének represszióját célzó jelátviteli folyamatban többféle a plasztiszból a magba irányuló szignálmolekula szerepét feltételezik (*Balczun és mtsai,*

2005). A Mg-protoporfirin IX-nek is szerepet tulajdonítanak a magba történő jelátvitelben (*Wilson és mtsai, 2006*). Ezzel összhangban van az a tapasztalat, hogy az *Lhcb* transzkripció szoros összefüggést mutat a Chl tartalommal (*Meehan és mtsai, 1996*).

A nyárfa Cd-stresszre adott válaszában tehát különösen fontos szerep jut az antennákat alkotó Lhc proteineknek. Szabályozzák a két PS közötti fény eloszlását, megelőzve a fotoinhibíciót. Csökkentik az elnyelt fény a reakciócentrum felé történő továbbításának hatékonyságát. Kooperációjuk megvalósulása vélhetően a közös transzkripciós szabályozásnak köszönhető. Az eltérő szabályozás alá eső Lhc fehérjékről pedig feltételezzük, hogy kivételezett funkciót tölthetnek be a fotoszintetikus folyamatok a folytonosan változó környezethez való megfelelő alkalmazkodásában.

VII. Összefoglalás

A minden élőlényre toxikus Cd a növények fejlődését, anyagcseréjét, így fotoszintetikus aktivitását is károsan befolyásolja. A fehérjékre gyakorolt közvetlen hatása az SH-csoportokhoz való kötődés és az esszenciális fémek kiszorítása. Közvetett hatásai közül az oxidatív stressz, valamint a vasháztartásban okozott zavarok elsődleges jelentőségűek a fotoszintézis szempontjából. Disszertációmban a tilakoidokba ágyazott pigment-protein komplexek szerveződésében és összetételében Cd-kezelés hatására bekövetkező változások, illetve ezek okainak feltárását tűztem ki célul. A komplexek makromolekuláris szerveződését BN/SDS PAGE és nanoHPLC módszerrel vizsgáltuk, a pigment- és fehérje-összetételükben bekövetkezett változásokat pedig HPLC és IEF/SDS-PAGE-el tártuk fel. Fluoreszcencia indukciós mérésekből a változások fiziológiai jelentőségére következtettünk. A stressz-folyamatok szabályozásába a génexpresszió transzkripciós szintű vizsgálatával (qPCR) nyertünk betekintést.

Eredményeink szerint fejlődő levelekben a Cd-stressz pigment-protein komplexek szerveződésére gyakorolt hatása főként a Cd-indukált vashiánnyal függött össze. Cukorrépában csökkent a fotoszisztémák (PS) szuperorganizációja. A részben leépült LHCII antenna következtében csökkent mértékű fényabszorpció pedig védelmet jelentett a relatív fényfelesleg ellen. A regenerációra képes nyárfa növényekben viszont a szuperorganizáció erősödött és az antennák jelentősebb része maradt meg. A szuperkomplexekbe szerveződött PSII és LHCII komplexek egy része inaktív, nem-fotokémiai kioltó centrumként működött, és biztosította a még működőképes PSII reakciócentrumoknak a fényfelesleg ellen védelmét. A PSI-hez kapcsolódó LHCII a ciklikus elektrontranszport intenzitásának növekedéséhez járult hozzá, ami fontos szerepet játszott az oxidatív stressz csökkentésében, valamint a károsodott komponensek regenerációjában.

A nyárfa pigment-protein komplexekben Cd-kezelés hatására bekövetkező strukturális és funkcionális változások részben az Lhc izoformák transzkripciós szintű változásaival hozhatók összefüggésbe. Az azonos komplexekbe együtt beépülő Lhc fehérjék transzkripciója esetében kooperatív Cd-indukált csökkenést mutattunk ki. Az eltérő transzkripciós szabályozást mutató Lhc izoformákról viszont feltételezhető, hogy kivételezett funkciót tölthetnek be a fotoszintetikus apparátus akklimatizációjában stressz-körülmények között.

VIII. Summary

Cd is a non-essential, highly toxic metal for all living organisms, thus it also causes diverse inhibitory effects on plant growth and metabolism including photosynthesis. Cd blocks protein function directly through binding to important SH-groups or by replacing essential metals. Among its numerous indirect effects, oxidative stress and disturbance of the iron household seems to be of prime importance from the point of view of photosynthetic processes.

The aim of this study was to evaluate changes in the composition and organization of thylakoid pigment-protein complexes under Cd stress with special emphasis on the mechanisms underlying these changes. The macromolecular organization of the thylakoids was studied by BN/SDS-PAGE combined with nanoHPLC MS for protein identification. The pigment- and protein composition of bands on BN gel were analizedby HPLC and IEF/SDS-PAGE. Fluorescence induction measurements were used to elucidate the physiological significance of the structural changes. A comprehensive transcriptional study of the expression of *Lhc* gene family was carried out in order to reveal the level of the regulation under Cd stress.

Our results proved that changes in the organization of the thylakoid pigment-protein complexes in developing leaves of Cd-treated plants are mainly due to the Cd-induced severe iron deficiency. In sugar beet, both stressors decreased the superorganization of the complexes and induced a reduction in the amount of LHCII antenna. Thus, light absorption decreased, which protected the photosynthetic apparatus from the excess light. Poplar plants, however, preserved the superorganization of complexes and a remarkable part of the LHCII antenna. Part of PSII and LHCII assembled into supercomplexes, which operated as dissipative centres protecting the PSII complexes still active. LHCII bound to PSI promoted the cyclic electron flow that helped to prevent the accumulation of the toxic ROS and provided energy for regeneration processes.

Organizational changes in poplar thylakoid pigment-protein complexes can partly be explained by the transcriptional changes in the gene expression of *Lhc* isoforms. Transcriptional patterns of the *Lhc* genes belonging to the same complex showed co-regulation. Lhc-s showing distinct regulation, however, seemed to have special roles in the acclimation of the photosynthetic apparatus under stress conditions.

Irodalomjegyzék

Abadía J, Morales F, Abadía A (1999): Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil 215: 183–192.*

Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Abadía A, Álvarez-Fernández A, López-Millán A-F (2011): Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol. Biochem. 49: 471-482.*

Adamska I (2001): The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of pro- and eukaryota. In: Aro EM, Andersson B (eds.) Regulation of Photosynthesis *Dordrecht/Boston/London: Kluwer Acad Publ, pp. 487-505.*

Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, de La Guardia MD (1994): Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. J. *Exp. Bot. 45: 1893-1898.*

Allen JF, de Paula WBM, Puthiyaveetil S, Nield J (2011): A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci 16: No. 12.*

Allen JF, Forsberg J (2001): Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci. 6: 317– 326.*

Amunts A, Drory O, Nelson N (2007): The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3,4 Å resolution. *Nature 447: 58-63.*

Andaluz S, López-Millán A-F, De las Rivas J, Aro E-M, Abadía J, Abadía A (2006): Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res. 89: 141–155.*

Anderson LE, Gibbons JT, Wang X (1996): Distribution of ten enzymes of carbon metabolism in pea (*Pisum sativum*) chloroplasts. *Int. J. Plant Sci. 157: 525–538.*

Andersson B, Aro EM (2001): Photodamage and D1 protein turnover in Photosystem II. In: Aro EM, Andersson B (eds.) Regulation of Photosynthesis *Dorrecht/Boston/London: Kluwer Acad. Publ., pp. 377-393.*

Apel K, Kloppstech K (1978): Phytochrome induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the lightharvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem. 85, 581–588.*

Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamäki E (2005): Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot. 56: 347-356.*

Arulanantham AR, Rao IM, Terry N (1990): Limiting factors in photosynthesis. VI. Regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiol. 93: 1466-1475.*

Avenson TJ, Ahn TK, Zigmantas D, Niyogi KK, Li Z, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2008): Zeaxanthin radical cation formation in minor light-harvesting complexes of higher plant antenna. *J. Biol. Chem. 283: 3550–3558.*

Axelrod HL, Abresch EC, Paddock ML, Okamura MY, Feher G (2000): Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1542-1547.*

Baker AJM, Ewart K, Hendry GAF, Thorpe PC, Walker PL (1990): The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. *In: 4th International Conference on Environmental Contamination, pp. 23-29, Barcelona, Spain.*

Baker NR (2008): Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol. 59: 89–113.*

Balczun C, Bunse A, Nowrousian M, Korbel A, Glanz S, Kück U (2005): DNA macroarray and real-time PCR analysis of two nuclear photosystem I mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* reveal downregulation of *Lhcb* genes but different regulation of *Lhca* genes. *Biochim. Biophys. Acta 1732: 62–68.*

Ballottari M, Girardon J, Dall'Osto L, Bassi R (2012): Evolution and functional properties of photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta 1817: 143–157.*

Barceló J, Poschenrieder C (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr. 13: 1-37.*

Barceló J, Vázquez MD, Poschenrieder C (1988): Structural and ultrastuctural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol. 108: 37-49.*

Basa B, Sárvári É, Tamás L (2009): Validation of housekeeping genes in poplar plants under Cd-stress: Comparison of methods developed for Real-Time PCR normalization. *Funct. Plant Biol. 36: 1079-1087.*

Bassi R, Pineau B, Dainese P, Marquardt J (1993) Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem. 212: 297-303.*

Battchikova N, Aro E-M (2008): Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (*Pisum sativum*). *Plant Cell Physiol. 49: 396–410.*

Belkhodja R, Morales F, Quílez R, López-Millán AF, Abadía A, Abadía J (1998): Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res. 56: 265–276.*

Benavides M, Gallego S, Tomaro M (2005): Cadmium toxicity in plants *Braz. J. Plant Physiol. 17: 21-34.*

Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N (2003): Crystal structure of plant photosystem I. *Nature 426: 630-635.*

Bertamini M, Muthuchelian K, Nedunchezhian N (2002): Iron deficiency induced changes on the donor side of PS II in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Plant Sci.e 162: 599-605.*

Bertrand M, Poirier I (2005): Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica 42: 345-353.*

Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R (2009): Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J. Biol. Chem. 284: 15255–15266.*

Blanc G, Wolfe KH (2004): Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell 16: 1679–1691.*

Böddi B, Oravecz AR, Lehoczki E (1995): Effect of cadmium on organisation and photoreduction of protochlorophyllide in dark-grown leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat. *Photosynthetica 31: 411-420.*

Boekema EJ, Jensen PE, Schlodder E, van Breemen JFL, van Roon H, Scheller HV, Dekker JP (2001): Green plant photosystem I binds light-harvesting complex I on one side of the complex. *Biochemistry 40: 1029-1036.*

Caffarri S, Frigerio S, Olivieri E, Righetti PG, Bassi R (2005): Differential accumulation of *Lhcb* gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plants grown under contrasting light and temperature conditions. *Proteomics 5: 758-768.*

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004): Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis 25: 1327–1333.*

Carlberg I, Hansson M, Kieselbach T, Schröder WP, Andersson B, Vener AV (2003): A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 757-762.*

Casneuf T, De Bodt S, Raes J, Maere S, Van de Peer Y (2006): Non-random divergence of gene expression following gene and genome duplications in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol. 7: R13.*

Chow WS, Lee HY, Park YI, Park YM, Hong YN, Anderson JM (2002): The role of inactive photosystem-II-mediated quenching in a last-ditch community defence against high light stress *in vivo*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. 357B: 1441–1450.*

Clemens S (2006): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie 88: 1707–1719.*

Crimi M, Dorra D, Bosinger CS, Giuffra E, Holzwarth AR, Bassi R (2001) Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant photosystem II antenna complex CP29 - Effects of zeaxanthin, pH and phosphorylation. *Eur. J. Biochem. 268: 260-267.*

Croce R, Morosinotto T, Castelletti S, Breton J, Bassi R (2002a) The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta 1556: 29-40.*

Croce R, Morosinotto T, Castelletti S, Breton J, Bassi R (2002b) The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1556: 29-40.

DalCorso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell 132: 273–285.*

Dall'Osto L, Caffarri S, Bassi R (2005): A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell 17: 1217–1232.*

Dall'Osto L, Cazzaniga S, Havaux M, Bassi R (2010): Enhanced photoprotection by protein-bound *vs* free xanthophyll pools: a comparative analysis of chlorophyll *b* and xanthophyll biosynthesis mutants. *Mol. Plant 3: 576–593.*

de las Rivas J, Abadía A and Abadía J (1989): A new reversed phase HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiol. 91: 190–192.*

Dekker JP, Boekema EJ (2005): Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta 1706: 12–39.*

Djebali W, Gallusci P, C Polge, Boulila L, Galtier N, Raymond P, Chaibi W, Brouquisse R (2008): Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and

activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta 227: 625–639.*

Donnini S, Castagna A, Guidi L, Zocchi G, Ranieri A (2003): Leaf responses to reduced iron availability in two tomato genotypes: T3238FER (iron efficient) and T3238fer (iron inefficient). *J. Plant Nutr. 26: 2137–2148.*

Donnini S, Zocchi G, Castagna A, Abdelly C, Ranieri A (2006): Identification of morphological, biochemical and physiological parameters useful to characterize nutritional stress status in arboreous species differently tolerant to chlorosis. In: Abdelley C, Ozturk M, Ashraf M, Grignon C (eds) Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance, *Birkhauser Verlag, Basel, pp 53–63.*

Durand TC, Sergeant K, Planchon S, Carpin S, Label P, Morabito D, Hausman J-F, Renaut J (2010): Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717-1B4 genotype): Leaf and cambial proteome changes induced by cadmium^{2+}. *Proteomics 1: 349–368.*

Escoubas J-M, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995): Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10237-10241.*

Fagioni M, D'Amici GM, Timperio AM, Zolla L (2009): Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Prot. Res. 8: 310–326.*

Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszkay A (2005) Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site. *Biochim. Biophys. Acta 1706: 158-164.*

Farah J, Rappaport F, Choquet Y, Joliot P, Rochaix JD (1995): Isolation of a psaF-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the PsaF subunit. *EMBO J. 14: 976–4964.*

Farinati S, DalCorso G, Bona E, Corbella M, Lampis S, Cecconi D, Polati R, Berta G, Vallini G, Furini A (2009): Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics 9: 4837–4850.*

Ferraro F, Castagna A, Soldatini GF, Ranieri A (2003): Tomato (*Lycopersicon esculentum M.*) T3238FER and T3238fer genotypes. Influence of different iron concentrations on thylakoid pigment and protein composition. *Plant Sci. 164: 783–792.*

Fischer N, Boudreau E, Hippler M, Drepper F, Haehnel W, Rochaix JD (1999): A large fraction of PsaF is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsaJ subunit. *Biochemistry 38: 5546–5552.*

Fodor F, Gáspár L, Morales F, Gogorcena Y, Lucena JJ, Cseh E, Kröpfl K, Abadía J, Sárvári É (2005): The effect of two different iron sources on iron and cadmium allocation in cadmium exposed poplar plants (*Populus alba L.*). *Tree Physiol. 25: 1173-1180.*

Frigerio S, Campoli C, Zorzan S, Fantoni LI, Crosatti C, Drepper F, Haehnel W, Cattivelli L, Morosinotto T, Bassi R (2007): Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. *J. Biol. Chem. 282: 29457–29469.*

Funk C, Schröder WP, Napiwotzki A, Tjus SE, Renger G, Andersson B (1995) The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry 34: 11133-11141.*

Fusco LN, Micheletto L, Corso GD, Borgato L, Furini A (2005): Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea*. *J. Exp. Bot. 56: 3017–3027.*

Galetskiy D, Susnea I, Reiser V, Adamska I, Przybylskia M (2008): Structure and dynamics of photosystem II light-harvesting complex revealed by high-resolution FTICR mass spectrometric proteome analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19: 1004–1013.*

Gallego SM, Benavídes M-P, Tomaro ML (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci. 121: 151-159.*

Ganeteg U, Klimmek F, Jansson S (2004): Lhca5 – an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant Mol. Biol. 54: 641–651.*

Gáspár L (2008): A Cd-stressz, a vashiány és a vízháztartási zavarok összefüggéseinek vizsgálata. Protektív mechanizmusok. *Doktori értekezés.*

Geiken B, Masojídek J, Rizzuto M, Pompili ML, Giardi MT (1998): Incorporation of [^{35}S] methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II

protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant Cell Environ. 21: 1265-1273.*

Golding AJ and Johnson GN (2003): Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta 218, 107–114.*

Golding AJ, Finazzi G, Johnson GN (2004): Reduction of the thylakoid electron transport chain by stromal reductants - evidence for activation of cyclic electron transport upon dark adaptation or under drought. *Planta 220: 356–363.*

Green BR, Durnford DG (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 685-714.*

Gruszecki WI, Strzalka K (2005): Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim. Biophys. Acta 1740: 108–115.*

Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W (2009): Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Struct. Mol. Biol. 16: 334-342.*

Haldrup A, Lunde C, Scheller HV (2003): *Arabidopsis thaliana* plants lacking the PSI-D subunit of photosystem I suffer severe photoinhibition, have unstable photosystem I complexes, and altered redox homeostasis in the chloroplast stroma. *J. Biol. Chem. 278: 33276–33283.*

Haldrup A, Naver H, Scheller HV (1999): The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant J. 17: 689–698.*

Haldrup A, Simpson DJ, Scheller HV (2000): Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *J. Biol. Chem. 275: 31211–31218.*

Hansson A, Amann K, Zygadlo A, Meurer J, Scheller HV, Jensen PE (2007): Knock-out of the chloroplast encoded PSI-J Subunit of Photosystem I in *Nicotiana tabacum*: PSI-J is required for efficient electron transfer and stable accumulation of photosystem I. *FEBS J. 274: 1734–1746.*

Hansson M, Dupuis T, Strömquist R, Andersson B, Vener AV, Carlberg I (2007): The mobile thylakoid phosphoprotein TSP9 interacts with the light-harvesting complex II and the peripheries of both photosystems. *J. Biol. Chem. 282: 16214–16222.*

Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R (2007): Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol. 145: 1506–1520.*

Heddad M, Adamska I (2000): Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3741-3746.*

Hendrickson L, Förster B, Pogson BJ, Chow WS (2005): A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of Photosystem II. *Photosynth. Res. 84: 43–49.*

Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette M-LM, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou J-P, Vavasseur A, Leonhardt N (2006): Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie 88: 1751-1765.*

Hodoshima H, Enomoto Y, Shoji K, Shimada H, Goto F, Yoshihara T (2007): Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency responsive genes in tobacco and barley. *Physiol. Plant. 129: 622-634.*

Hoober JK, Eggink LL, Chen M (2007): Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynth. Res. 94: 387–400.*

Hsu WP, Miller GW (1970): Coproporphyrinogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Biochem. J. 117: 215-220.*

Huber CG, Timperio AM, Zolla L (2001): Isoforms of photosystem II antenna proteins in different plant species revealed by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Biol. Chem. 27: 6 45755-45761.*

Jansson S (1994): The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim Biophys Acta 1184: 1–19.*

Jansson S (1999): A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci. 4: 236–240.*

Jansson S, Andersson J, Kim SJ, Jackowski G (2000): An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol. Biol. 42: 345-351.*

Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å (1997): Antenna protein composition of PSI and PSII in thylakoid sub-domains. *Biochim. Biophys. Acta 1320: 297-309.*

Jensen PE, Bassi R, Boekema EJ, Dekker JP, Jansson S, Leister D, Robinson C, and Scheller HV (2007): Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta 1767: 335–352.*

Jeong J, Connolly EL (2009): Iron uptake mechanisms in plants: functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Sci. 176: 709-714.*

Joliot P and Joliot A (2002): Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9: 10209–10214.*

Joliot P, Joliot A (2006): Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim. Biophys. Acta 1757: 362–368.*

Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL (1998): RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal. Biochem. 265: 368-374.*

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N (2001): Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. *Nature 411: 909-917.*

Kargul J, Barber J (2008): Photosynthetic acclimation: structural reorganisation of light harvesting antenna — role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll *a/b* binding proteins. *FEBS J. 275: 1056–1068.*

Kellmann JW, Merforth N, Wiese M, Pichersky E, Piechulla B (1993): Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen Lha/b (cab) genes in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Mol. Gen. Genet. 237: 439–448.*

Kieffer P, Schröder P, Dommes J, Hoffmann L, Renaut J, Hausman J-F (2009): Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. Proteomics 72: 379–396.*

Kleine T, Voigt C, Leister D (2009): Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends Genet. 25: 185–192.*

Klimmek F, Sjödin A, Noutsos C, Leister D, Jansson S (2006): Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiol. 140: 793–804.*

Kouril R, Zygadlo A, Arteni AA, de Wit CD, Dekker JP, Jensen PE, Scheller HV, Boekema EJ (2005): Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry 44: 10935-10940.*

Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004): New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res. 79: 209–218.*

Krupa Z (1988): Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting complex II in radish cotyledons. *Physiol. Plant. 73: 518-524.*

Krupa Z, Baszynski T (1995): Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus - direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant. 17: 177-190.*

Kučera T, Horáková H, Šonská A (2008): Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. *Photosynthetica 46: 481-489.*

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227: 680-685*.

Langham RJ, Walsh J, Dunn M, Ko C, Goff SA, Freeling M (2004): Genomic duplication, fractionation and the origin of regulatory novelty. *Genetics 166: 935–945.*

Larbi A, Abadía A, Abadía J, Morales F (2006): Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res. 89:.113–126.*

Larbi A, Morales F, Abadía A, Gogorcena Y, Lucena JJ, Abadía J (2002): Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct. Plant Biol. 29: 1453-1464.*

Lascelles J (1975): The regulating of heme and chlorophyll synthesis in bacteria. In: The Biological Role of Porphyrins and Related Structures. Alder A *(ed.) Acad. Sci., New York, pp.334-337.*

Latowski D, Kruk J, Strzałka K (2005): Inhibition of zeaxanthin epoxidase activity by cadmium ions in higher plants. *J. Inorg. Biochem. 99: 2081-2087.*

Leister D, Wang X, Haberer G, Mayer KFX, Kleine T (2011): Intracompartmental and intercompartmental transcriptional networks coordinate the expression of genes for organellar functions. *Plant Physiol. 157: 386–404.*

Li XP, Bjorkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature, 403: 391-395.*

Libus J, Štorchová H (2006): Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *Biotechniques 41: 156-164.*

Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W (2004): Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 A resolution, *Nature 428: 287–292*.

Livingston AK, Cruz JA, Kohzuma K, Dhingra A, Kramer DM (2010): An *Arabidopsis* mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell 22: 221–233.*

Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J (2005): Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature 438: 1040-1044*.

Lucinski R, Schmid VHR, Jansson S, Klimmek F (2006): Lhca5 interaction with plant photosystem I. *FEBS Lett. 580: 6485–6488.*

Maere S, De Bodt S, Raes J,Casneuf T, Van Montagu M, Kuiper M,Van de Peer Y (2005): Modelling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5454–5459.*

Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Matthuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001): Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol. 126: 1646-1667*.

Meehan LA, Harkins K, Chory J, Rodermel S (1996): Lhcb transcription is coordinated with cell size and chlorophyll accumulation. Studies on fluorescence-activated, cell-sorter-purified single cells from wild-type and *immutans Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 112: 953-963.*

Mick V, Geister S, Paulsen H (2004): The folding state of the lumenal loop determines the thermal stability of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry 4: 14704–14711.*

Miller GW, Denney A, Pushnik J, Yu MH (1982): The formation of delta-aminolevulinate, a precursor of chlorophyll, in barley and the role of iron. *J. Plant. Nutr. 5: 289-300.*

Mishliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K (2002): Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. In: Prasad MNV, Strzalka K (eds.) Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. *The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 229-255.*

Mishliwa-Kurdziel B, Strzalka K (2002a): Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. In: Prasad MNV, Strzalka K (eds.) Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. *The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 201-227.*

Morales F, Abadía A, Abadía J (1991): Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol. 94: 607–613.*

Morales F, Belkhodja R, Abadía A, Abadía J (2000): Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis L.*). *Photosynth. Res. 63: 9–21.*

Morales F, Moise N ,Quilez R, Abadıa A, Abadıa J, Moya I (2001): Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of photosystem II. *Photosynt. Res. 70: 207–220.*

Morre DJ, Seliden G. Sundqvist C, Sandelius AS (1991): Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. *Plant Physiol. 97: 1558–1564.*

Moseley JL, Allinger T, Herzog S, Hoerth P, Wehinger E, Merchant S, Hippler M. (2002): Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.l 21: 6709–6720.*

Müller MG, Lambrev P, Reus M, Wientjes E, Croce R, Holzwarth AR (2010): Singlet energy dissipation in the photosystem II light-harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids. *Chem Phys Chem 11: 1289–1296.*

Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K-I, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004): Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature 429: 579-582*.

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002): PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell 110: 361–371.*

Nelson N, Ben-Shem A (2004): The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5: 971-982.*

Nelson N, Ben-Shem A (2004): The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5: 971-982.*

Nelson N, Yocum CF (2006): Structure and function of photosystem I and II. *Annu. Rev. Plant Biol. 57: 521-565.*

Niyogi KK (2000): Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol. 3: 455-460.*

Nováková M, Matějová E, Sofrová D (2004): Cd^{2+} effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica 42: 425-430.*

Nyitrai P, Bóka K, Gáspár L, Sárvári É, Lenti K, Keresztes Á (2003) Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *J. Plant Physiol. 160: 1175-1183.*

Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1990): Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica 24: 399-405.*

Pan XW, Li M, Wan T, Wang LF, Jia CJ, Hou ZQ, Zhao XL, Zhang JP, Chang WR (2011): Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature Struct. Mol. Bio.l 18: 309–315.*

Passarini F, Wientjes E, Hienerwadel R, Croce R (2009): Molecular basis of light harvesting and photoprotection in CP24. Unique features of the most recent antenna complex. *J. Biol. Chem. 284: 29536–29546.*

Patsikka E, Kairavuo M, Sersen F (2002): Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition *in vivo* by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol. 129: 1359-1367.*

Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Takami T, Shikanai T (2009): Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell 21: 3623–3640.*

Peng L, Shimizu H, Shikanai T (2008): The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in Arabidopsis. *J. Biol. Chem. 283: 34873–34879.*

Peng L, Yamamoto H, Shikanai T (2011): Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta 1807: 945–953.*

Pfannschmidt T (2003): Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci. 8: 33-41.*

Pfannschmidt T, Bräutigam K, Wagner R, Dietzel L, Schröter Y, Steiner S, Nykytenko A (2009): Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Ann Bot. 103: 599–607.*

Platt-Aloia KA, Thomson WW, Terry N (1983): Changes in plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol. 78: 269–299.*

Pogson BJ, Woo NS, Förster B, Small ID (2008): Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci. 13: 602–609.*

Porra RJ, Thompson WA, Kriedman PE (1989): Determination of accurate excitation coefficient and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta 975: 384-394.*

Prasad MNV (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot. 35: 525-545.*

Pursiheimo S, Mulo P, Rintamäki E, Aro EM (2001): Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and lhcb mRNA accumulation in winter rye. *Plant J. 26: 317-327.*

Qureshi MI, D'Amici GM, Fagioni M, Rinalducci S, Zolla L (2010): Iron stabilizes thylakoid protein-pigment complexes in Indian mustard during Cd-phytoremediation as revealed by BN-SDS-PAGE and ESI-MS/MS. *J. Plant Physiol. 167: 761-770.*

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett. 339: 62-66.*

Reinbothe C, Bartsch S, Eggink LL, Hoober JK, Brusslan J, Andrade-Paz R, Monnet J, Reinbothe S (2006): A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins. *Proc Natl Acad Sci USA 103: 4777–4782.*

Reisinger V, Eichacker LA (2007): How to analyze protein complexes by 2D Blue Native SDS-PAGE. *Pract. Proteomics 1: 6-16.*

Rochaix JD (2011): Assembly of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol. 155:, 1493–1500.*

Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, del Río LA, Sandalio LM (2009): Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol. 150: 229-243.*

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006): Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675–709.*

Ross K (2010): A tilakoidok szerveződésbeli változásai Cd stressz hatására. *Szakdolgozat, ELTE, Biológiai Intézet, Növényélettani és Mol. Növénybiol.Tanszék.*

Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012): The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta 1817: 167–181.*

Ruban AV, Solovieva S, Lee PJ, Ilioaia C, Wentworth M, Ganeteg U, Klimmek F, Chow WS, Anderson JM, Jansson S, Horton P (2006): Plasticity in the composition of the light-harvesting antenna of higher plants preserves structural integrity and biological function. *J. Biol. Chem. 281: 14981–14990.*

Saito A, Iino T, Sonoike K, Miwa E, Higuchi K (2010): Remodeling of the major light-harvesting antenna protein of PSII protects the young leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) from photoinhibition under prolonged iron deficiency. *Plant Cell Physiol. 51: 2013–2030.*

Sanita di Toppi L, Gabrielli R (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot. 41: 105-130.*

Sárvári É (2005): Effects of heavy metals on chlorophyll-protein complexes in higher plants: Causes and consequences. *In: Handbook of Photosynthesis (M. Pessarakli, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 865-888.*

Sárvári É, Solti Á, Basa B, Mészáros I, Lévai L, Fodor F (2011): Impact of moderate Fe excess under Cd stress on the photosynthetic performance of poplar (*Populus jaquemontiana var. glauca* cv. Kopeczkii). *Plant Physiol. Biochem. 49: 499-505.*

Schägger H, von Jagow G (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane proteinc in enzimatically active form. *Anal. Biochem. 199: 223-231.*

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genet. 37: 501–506.*

Schmid VHR (2008): Light-harvesting complexes of vascular plants *Cell. Mol. Life Sci. 65: 3619-3639*.

Seelert H, Dencher NA, Müller DJ (2003): Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *J. Mol. Biol. 333: 337-344.*

Shi LX, Hall M, Funk C, Schröder WP (2012): Photosystem II, a growing complex: Updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochim. Biophys. Acta 1817 13–25.*

Shikanai T (2007a): Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol. 58: 199–217.*

Shikanai T (2007b): The NAD(P)H dehydrogenase complex in photosynthetic organisms: subunit composition and physiological function. *Funct. Plant Sci. Biotechnol. 1: 129–137.*

Siedlecka A (1995): Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc. Bot. Pol. 3: 265-272.*

Siedlecka A, Baszynski T (1993): Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol. Plant. 87: 199-202.*

Siedlecka, A, Krupa Z (1999): Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica 36: 321-331.*

Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F, Styring S (2004): Molecular interference of Cd^{2+} with Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta 1659: 19-31.*

Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F, Styring S (2004): Molecular interference of Cd^{2+} with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta 1659: 19–31.*

Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A (2008): Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ. Exp. Bot. 63: 1–8.*

Soldatini GF, Tognini M, Baldan B, Castagna A, Ranieri A (2000): Alterations in thylakoid membrane composition induced by iron starvation in sunflower plants. *J. Plant Nutr. 23: 1717–1732.*

Solti Á (2012): Cd-Fe interferencia a vasháztartásban és a fotoszintézisben. *Doktori értekezés.*

Solti Á, Szűcs J, Basa B, Sárvári É (2009): Functional and organisational change of photosystem II in poplar thylakoids under Cd stress. *Cereal Res. Commun. 37: 525-528.*

Spiller S, Terry N (1980): Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol. 65: 121–125.*

Spiller SC, Castelfranco AM, Castelfranco PA (1982): Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. I. *In vivo* observations on iron and oxygen-deficient plants. *Plant Physiol. 69: 107-111.*

Stiborová M (1988): Cd^{2+} ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves. *Biochem. Physiol. Pflanzen 183: 371-378.*

Storf S, Jansson S, Schmid VHR (2005) Pigment Binding, Fluorescence properties, and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein. *J. Biol. Chem. 280: 5163–5168.*

Storf S, Stauber EJ, Hippler M, Schmid VHR (2004) Proteomic analysis of the photosystem I light-harvesting antenna in tomato (*Lycopersicon esculentum). Biochemistry 43: 9214-9224.*

Suh HJ, Kim CS, Jung J (2000): Cytochrome b_6/f complex as an indigenous photodynamic generator of singlet oxygen in thylakoid membranes. *Photochem. Photobiol. 71: 103-109.*

Suorsa M, Regel RE, Paakkarinen V, Battchikova N, Herrmann RG, Aro EM (2004): Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ. *Eur. J. Biochem. 271: 96–107.*

Süss KH, Arkona C, Manteuffel R, Adler K (1993: Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5514–5518.*

Swiatek M, Regel RE, Meurer J, Wanner G, Pakrasi HB, Ohad I, Herrmann RG (2003): Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the psbEFLJ operon in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Genet. Genomics 268: 699–710.*

Takabayashi A, Kurihara K, Kuwano M, Kasahara Y, Tanaka R, Tanaka A (2011): The oligomeric states of the photosystems and the light-harvesting complexes in the Chl *b*-less mutant. *Plant Cell Physiol. 52: 2103–2114.*

Takahashi S, Murata N (2008): How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci. 13: 178-182.*

Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K (1998): Chlorophyll *a* oxygenase (*CAO*) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12719–12723.*

Teramoto H, Nakamori A, Minagawa J, Ono T (2004): High-intensity-light-dependent and transient expression of new genes encoding distant relatives of light-harvesting

chlorophyll-*a/b* proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol. 45: 1221-1232.*

Terry N, Abadia J (1986): Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr. 9: 609-646*.

Terry N, Rao IM (1991): Nutrients and photosynthesis: iron and phosphorus as case studies. In: JR Porter, DW Lawlor (eds), Plant Growth: Interactions with Nutrition and Environment. *Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 55-79.*

Thompson WF, White MJ (1991): Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 423–466.*

Timperio AM, D'Amici GM, Barta C, Loreto F, Zolla L (2007): Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot. 58: 3695-3710.*

Timperio AM, Gevi F, Ceci LR, Zolla L (2012): Acclimation to intense light implies changes at the level of trimeric subunits involved in the structural organization of the main light-harvesting complex of photosystem II (LHCII) and their isoforms. *Plant Physiol. Biochem. 50: 8-14.*

Tottey S, Block MA, Allen M, Westergren T, Albrieux C, Scheller HV, Merchant S, Jensen PE (2003): Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 16119–16124.*

Tziveleka L, Kaldis A, Hegedűs A, Kissimon J, Prombona A, Horváth G, Argyroudi-Akoyunoglou J (1999): The effects of Cd on chlorophyll and light-harvesting complex II biosynthesis in greening plants. *Z. Naturforsch. 54C: 740-745.*

van Assche F, Clijsters H (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.

Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006): Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ. 29: 950–963.*

Webster EA, Gadd GM (1996): Cadmium replaces calcium in the cell wall of *Ulva lactuca*. *BioMetals 9: 241-244.*

Wilson KE, Ivanov AG, Öquist G, Grodzinski B, Sarhan F, Huner NPA (2006): Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Canad. J. Bot. 84: 1355-1370.*

Wilson KE, Sieger SM, Huner NPA (2003): The temperature-dependent accumulation of Mg-protoporphyrin IX and reactive oxygen species in *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plant. 119: 126–136.*

Winder TL, Nishio J (1995): Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet, *Plant Physiol. 108: 1487-1494.*

Winder TL, Nishio JN (1995): Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet. *Plant Physiol. 108: 1487–1494.*

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007): An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE 2: e718.*

Yang D-H, Bertil Andersson, Aro E-M, Ohad I (2001): The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein complex II (LHCII) during photoacclimation. Cytochrome b_6f deficient *Lemna perpusilla* plants are locked in a state of high-light acclimation. *Photosynthesis Research 68: 163–174.*

Yang TJW, Lin W-D, Schmidt W (2010): Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* iron deficiency response reveals conserved transition metal homeostasis networks. *Plant Physiol. 152: 2130–2141.*

Yeh C-M, Chien P-S, Huang H-J (2007): Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J. Exp. Bot. 58, 659–671.*

Yu MH, Miller GW (1982): Formation of delta-aminolevulinic acid in etiolated and iron-stressed barley. *J Plant Nutr 5: 1259-1271.*

Z'elisko A, Garcia-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C (2005): AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 13699–13704.*

Zolla L, Rinalducci S, Timperio AM (2007): Proteomic analysis of photosystem I components from different plant species. *Proteomics 7: 1866–1876.*

Zolla L, Timperio AM, Walcher W, and Huber CG (2003): Proteomics of light harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid

chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Photosystem II. *Plant Physiol. 131: 198–214.*

Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P (2001): Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature 409: 739–743.*

Köszönetnyilvánítás

Prof. Dr. Szigeti Zoltán, DSc, tanszékvezetı egyetemi tanárnak,
hogy lehetővé tette a munka kivitelezését,

valamint témavezetőimnek,
Dr. Sárvári Éva, CSc, egyetemi docensnek,
és
Dr. habil. Tamás László, PhD, egyetemi docensnek,
továbbá
Dr. habil. Fodor Ferenc, PhD, egyetemi docens, pályázatvezetőnek,
hogy megteremtették a feltételeket a kísérletekhez és irányították munkám menetét a
ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén.

Köszönnöm **Solti Ádám, PhD**, egyetemi tanársegédnek segítőkészségét és hasznos tanácsait,
valamint pályázati partnerünknek, **Javier Abadiának**, hogy rendelkezésemre bocsátotta laboratóriumát és tanácsaival segítette a cukorrépa növényeken végzett kísérletek kivitelezését.

Köszönet Dr. Lévai Lászlónak és Tóth Brigittának
az elemanalitikai vizsgálatokért.

A kutatásokat az **OTKA NN-74045** számú pályázata, valamint az Európai Únió **TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0003** számú pályázata támogatta.