

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Karotenoidi kao pomoćni i zaštitni pigmenti u
fotosintezi

Carotenoids as accessory and protective pigments in
photosynthesis

Jelena Kovačević
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Zagreb, 2010.

Sadržaj

| | |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Uvod..... | 3 |
| 1.1. Građa karotenoida..... | 4 |
| 2. Karotenoidi kao pomoćni pigmenti u fotosintezi | 6 |
| 3. Karotenoidi kao zaštitni pigmenti..... | 10 |
| 3.1. Fotokemijsko utišavanje | Error! Bookmark not defined. 1 |
| 3.2. Nefotokemijsko utišavanje | Error! Bookmark not defined. 3 |
| 4. Zaključak | 188 |
| 5. Literatura..... | 19 |
| 6. Sažetak | 21 |
| 7. Summary..... | 22 |

1. Uvod

Dvije glavne funkcije karotenoida u fotosintetskim mikroorganizmima i biljkama su apsorpcija energije za korištenje u fotosintezi i zaštita klorofila od oštećenja uzrokovanih svjetlošću. Oni predstavljaju jednu od najraširenijih i najbrojnijih skupina prirodnih pigmenata. Fotosintetski organizmi (anoksigene fotosintetske bakterije, cijanobakterije, alge, biljke) i brojne nefotosintetske bakterije i gljive proizvode karotenoide. U biljkama su vidljivi u cvjetovima, plodovima i gomoljima u obliku žutih, narančastih i crvenih pigmenata, a u zelenim biljnim tkivima karotenoidi su vidljivi samo tijekom godišnje razgradnje klorofila u jesen. Osim organizama koji ih proizvode, prisutni su i u drugim organizmima (uneseni u obliku hrane), bilo u izvornom obliku ili metabolizirani.

Osim njihove očite uloge vizualno privlačnih pigmenata, karotenoidi sudjeluju u mnoštvu esencijalnih bioloških funkcija. Općenito, obojeni karotenoidi vrše fotooksidativnu zaštitu od negativnih učinaka kisikovih radikala i radikala nastalih pod utjecajem svjetlosti koji mogu fotooksidirati klorofile, hem-skupinu i protoporfirin IX. Nadalje, imaju ulogu prijenosa svjetlosne energije i strukturnu ulogu „molekularnog ljepila“ pigment-protein u fotosintetskim kompleksima. Osim toga, cijepanje specifičnih cikličnih epoksi-ksantofila koji sadrže prstenove na jednom ili oba kraja je početna reakcija u biosintezi apscizinske kiseline, važnog biljnog hormona. Uloga karotenoida kao esencijalnih bioloških spojeva nije ograničena samo na biljke, kao ni njihova sinteza. Npr. p-karoten i strukturalno slični spojevi služe kao prekursori za sintezu vitamina A, retinala i retinoične kiseline u sisavaca gdje imaju esencijalnu ulogu u prehrani, vidu i staničnoj diferencijaciji.

Ime „karoten“ prvi je 1831. godine predložio Wackenroder prilikom opisivanja pigmenta kojeg je izolirao i kristalizirao iz korijenja mrkve. 1837. godine Barzelius je osmislio naziv ksantofil kao kemijsku oznaku žutog pigmenta kojeg je ekstrahirao iz otpalog lišća. Tswett, uočavajući kemijsku sličnost spojeva poznatih kao karoteni i ksantofili, uvodi naziv karotenoidi 1911. godine kao oznaku za obje skupine pigmenata. Danas se naziv karoten koristi za ugljikohidratne karotenoide, a ksantofil označava karotene koji sadrže jednu ili više funkcionalnih skupina s kisikom (Armstrong i Hearst, 1966).

Danas, gotovo dva stoljeća nakon Wackenroderove izolacije prvog karotena, poznato je više od šest stotina različitih karotenoida i njihovih glikozida te različitih izomera.

1.1. Građa karotenoida

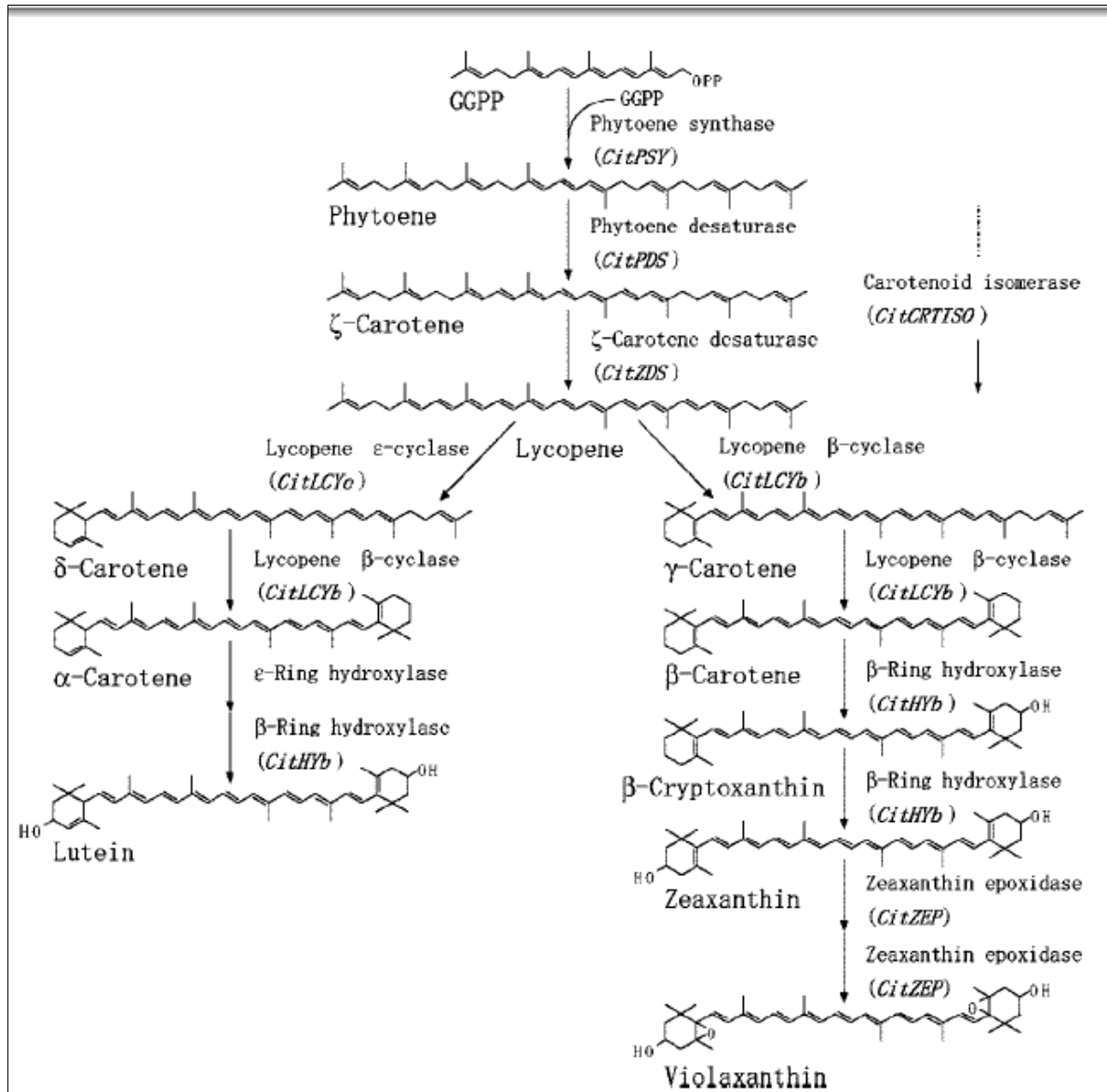
Karotenoidi su linearne organske molekule s višestruko konjugiranim dvostrukim vezama. Spadaju u kategoriju tetraterpenoida, tj. među spojeve koji sadrže po 40 C-atoma; no postoje i C45 odnosno C50 karotenoidi. Polienski lanci mogu i ne moraju završavati prstenima. Karoteni su najčešće građeni samo od ugljika i vodika, pa su nepolarne molekule topive u mastima. Za razliku od karotena, ksantofili imaju funkcionalne skupine koje sadrže kisik i stoga su polarniji. Prema funkcionalnim skupinama koje sadrže, karotenoide dijelimo na: ugljikovodike (karoteni), alkohole, glikozide, etere, epokside, aldehide, kiseline i njihove estere, ketone, estere alkohola, apo karotenoide, nor i seko karotenoide, retro i retro apo karotenoide, te više karotenoide (<http://en.wikipedia.org/wiki/Carotenoid>).

Karotenoidi su žuti, narančasti ili crveni pigmenti – njihov apsorpcijski spektar je između 400 i 500 nm (posljedica konjugiranih dvostrukih veza). Ksantofili su većinom pigmenti žute boje.

Prvi put su se javili u arheobakterija, kao lipidi u svrhu ojačavanja staničnih membrana. Njihova strukturna uloga zasniva se na njihovoj građi u obliku dugačkih molekula s ekstremno čvrstom osnovom zbog postojanja mnogih konjugiranih trans dvostrukih veza između ugljikovih atoma (obično 10-11 trans C=C veza u nizu), a dužina molekula odgovara debljini hidrofobne zone. Karotenoidi su izvrstan primjer evolucijske preadaptacije – razvoj nove osobine porijeklom od mutacija koje su se nakon promjene u vanjskoj sredini pokazale kao korisna adaptacija zahvaljujući strukturama koje mogu obavljati nove funkcije. Drugim riječima nakon promjene u okolišu javljaju se nove funkcije bez daljnjih genetičkih promjena. Svoju strukturnu funkciju karotenoidi su zadržali u nekim gljivama i životinjama. U biljnim organizmima su različite funkcionalne skupine i strukturna svojstva karotenoida razvila specifične funkcije poput uloge apsorpcijskih pigmenta i uloge antioksidanata. Štoviše, njihova se efikasnost u tim ulogama pokazala izrazito velikom (Vershinin, 1999.).

Prvi korak u biosintezi karotenoida je kondenzacija dviju molekula geranilgeranil pirofosfata (GGPP) i stvaranje bezbojnog fitoena uz pomoć enzima fitoen sintaze. GGPP je intermedijer u mevalonatnom metaboličkom putu biljaka. Zatim fitoen desaturaza i ζ-karoten desaturaza uvode četiri dvostruke veze na fitoen i kroz nakoliko koraka nastaje likopen. Isti proces može katalizirati enzim karotenoid izomeraza. Ciklizacija likopena je kritična točka grananja u biosintezi karotenoida. Likopen β-ciklaza katalizira sintezu β-karotena sa dva β-prstena, dok likopen ε-ciklaza katalizira sintezu α-karotena koji je građen od ε-prstena i β-

prstena. α -karoten prelazi u lutein uzastopnim hidrosilacijama kataliziranim enzimima hidrosilazama. Hidrosilacija β -karotena hidrosilazom dovodi kroz nekoliko koraka do sinteze zeaksantina. Zeaksantin potom uz prisutnost enzima zeaksantin epoksidaza prelazi u anteraksantin i potom u violaksantin.



Slika 1. Shema biosinteze karotenoida u biljkama. (prema Kato i sur., 2004)

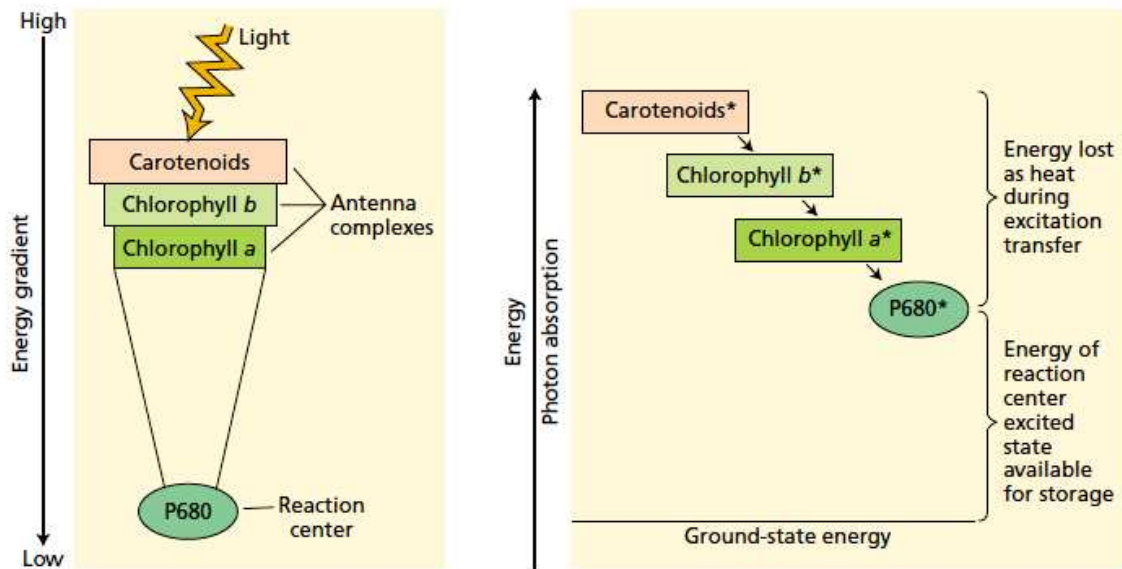
2. Karotenoidi kao pomoćni pigmenti u fotosintezi

Naziv fotosinteza doslovno znači sinteza pomoću svjetla. To je biološki proces stvaranja energetski bogatih ugljikohidrata iz anorganskih spojeva kao što su CO_2 i H_2O , a odvija se u mnogim bakterijama i jednostaničnim eukariotima (alge), kao i u vaskularnim biljkama. Premda se proces u tim organizmima razlikuje u detaljima, osnovni mehanizmi su slični. Štoviše, mnogo detalja o fotosintezi u vaskularnim biljkama je objašnjeno zahvaljujući pokusima na jednostavnijim organizmima.

Fotosintezu dijelimo na anoksienu (purpurne i zelene sumporne bakterije) i oksigenu (cijanobakterije, alge i biljke). Oksigena fotosinteza kao sekundarni produkt stvara kisik tijekom procesa cijepanja vode. Za razliku od anoksiene fotosinteze koja za prijenos energije koristi samo jedan reakcijski centar, oksigena fotosinteza zahtjeva dva reakcijska centra – fotosistem II (PSII) gdje se odvija oksidacija vode do kisika uz otpuštanje elektrona i protona i gdje nastaje jaki oksidans, te fotosistem I (PSI) gdje nastaje jaki reducens. PSII apsorbira svjetlost valne duljine od 680 nm, a PSI 700 nm.

Glavnu ulogu u apsorpciji svjetlosti imaju pigmenti. Oni zajedno sa proteinima tvore reakcijski centar i pripadajuće antenske komplekse (LHC), odnosno fotosistem. U reakcijskom centru se odvijaju oksidacijsko-redukcijski procesi koji rezultiraju stvaranjem elektrona e^- i protona H^+ . Ti kemijski procesi su rezultat razdvajanja naboja u reakcijskom centru. Na taj način svjetlosna energija prelazi u kemijsku energiju, odnosno svjetlost potiče kemijske reakcije koje rezultiraju stvaranjem energetski bogatih spojeva. Kompleksi antena služe za skupljanje i prijenos svjetlosne energije na dimer klorofila *a* u reakcijskom centru i na svaki reakcijski centar dolazi mnogo antenskih kompleksa (tridesetak bakterioklorofila, dvjestotinjak u višim biljkama, te nekoliko tisuća u nekim algama i bakterijama). Njihova građa je takva da energija prelazi s pigmenta koji apsorbiraju svjetlost manje valne duljine (veća energija) na pigmente koji apsorbiraju svjetlost veće valne duljine usput otpuštajući dio energije u obliku topline (Slika 2.). Naime, kada molekula apsorbira foton, prelazi iz nepobuđenog u pobuđeno stanje bogato energijom. Ta energija se rezonantno prenosi na susjedni pigment koji postaje pobuđen a molekula koja je apsorbirala foton se vraća u nepobuđeno stanje. Energija pobuđenog stanja koju apsorbira susjedni pigment je manja zbog gubitka u obliku topline i to omogućuje usmjereni prijenos energije s molekule na molekulu. Konačni akceptor je molekula klorofila *a* u reakcijskom centru koja se oksidira i predaje svoj elektron primarnom akceptoru elektrona. PSI i njegove antene tvore supramolekularni

kompleks građen od tri identična dijela s po jedanaest proteina. Reakcijski centar je smješten u sredini, a mnogobrojne molekule klorofila i karotenoida su precizno smještene oko njega. PSII nije fizički asociran s antenskim kompleksima, već su oni slobodno razmješteni po tilakoidnoj membrani, odnosno asociraju i disociraju s PSII ovisno o omjeru reduciranih i oksidiranih plastokinona (PSII ih reducira, a PSI oksidira) (Taiz i Zeiger, 2002).

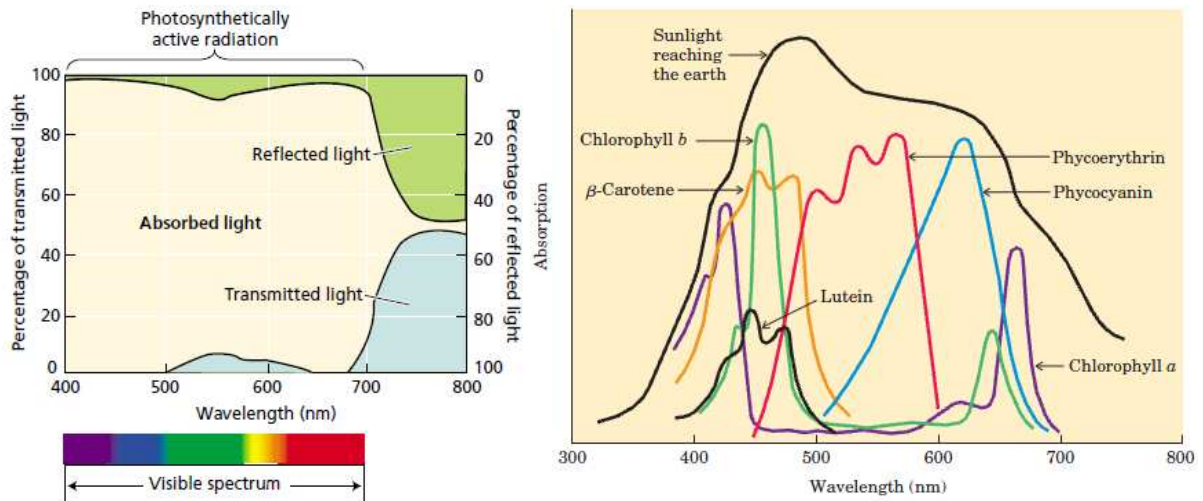


Slika 2. Prikaz prijenosa energije iz antenskog kompleksa na reakcijski centar (prema Taiz i Zeiger, 2002).

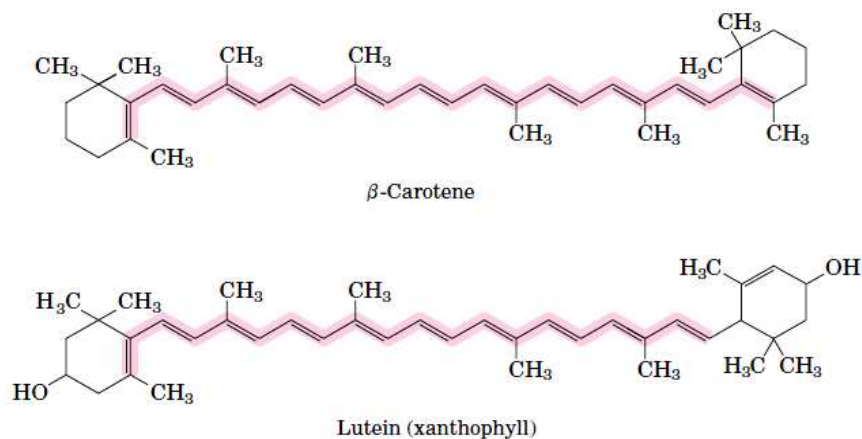
Fotokemijsko središte PSII je građeno od D1 i D2 proteina koji tvore heterodimer. Građeni su u obliku pet transmembranskih uzvojnica na koje su vezani kofaktori – klorofili P680, Q_A i Q_B , ioni željeza, pomoćni klorofili, feofitin, β -karoteni, te Mn kompleks na kojem se odvija redukcija vode. Elektroni se sa pobuđenog P680 prenose na feofitin te dalje na dvije molekule plastokinona - prvo na Q_A a zatim na Q_B . Potom se $P680^+$ nastao nakon otpuštanja elektrona reducira tirozinskom skupinom Z D1 podjedinice. Z elektron preuzima s Mn kompleksa iz reakcije cijepanja vode (Buchanan i sur., 2002). Uz D1 i D2 su periferno smješteni dodatni proteini poput PsbI i PsbS, citokrom b-559, CPa-1 i CPa-2. Neki su bitni za prijenos energije sa LHC na reakcijski centar, neki sudjeluju u stvaranju kisika, a neki su bitni za pravilnu formaciju reakcijskog centra (Ort i sur., 1996).

Karotenoidi su zahvaljujući apsorpcijskom spektru od 400-500 nm (Slika 3.) jako zastupljeni u antenskim kompleksima kao primarni akceptori fotona jer je u tom dijelu spektra apsorpcija pomoću klorofila relativno slaba. Oni apsorbiraju energetski bogatu svjetlost u plavom i ljubičastom dijelu spektra i zatim ju prenose (uz povećanje valne duljine i smanjenje

energije) na druge pigmente, sve do klorofila *a* u reakcijskom centru koji apsorbiraju svjetlost u crvenom i tamnocrvenom dijelu spektra (Slika 2.). Najvažniji karotenoidi u antenama biljaka su crveno-narančasti izoprenoid β -karoten i žuti ksantofil lutein (Slika 4.). Alge u antenama imaju lutein (klorofiti), fukoksantin (kromofiti), perdinin (dinofiti) i zeaksantin (rodofiti) (Grabowski i sur., 2001).



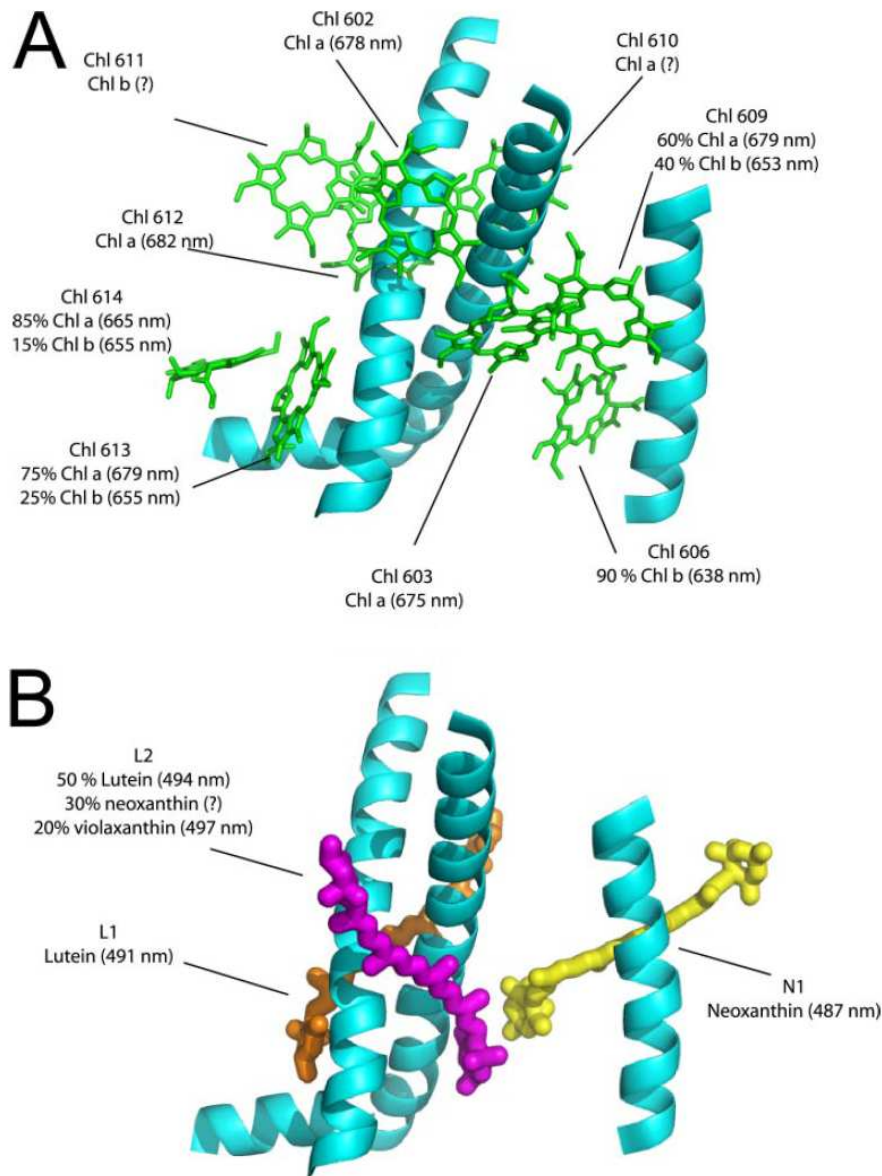
Slika 3. Apsorpcijski spektral lista (lijevo) i nekih fotopigmenata (desno) (prema Nelson i Cox, 2005).



Slika 4. Građa β -karotena i luteina (prema Taiz i Zeiger, 2002).

Antenske komplekse tvore proteini i pigmenti. Način vezanja karotenoida na polipeptide koji tvore antenske komplekse nije do kraja istražen, ali analize PSI i PSII ukazuju da aromatske skupine tvore značajan dio veznih mjesta. Mutacija gena za dva fenilalanina u LHCII (antenski kompleks vezan uz PSII) rezultira gubitkom gotovo 50% funkcionalnih karotenoida (García-Martín i sur., 2008). LHCII je trimer čiji monomer sadrži 4 vezna mjesta za karotenoide (Liu i sur., 2004). Karotenoidi (i klorofili) sami po sebi nisu dovoljni za usmjeravanje energije na reakcijski centar, već važnu ulogu u organizaciji prijenosa energije

kroz kompleks imaju sami protein koji ih vežu (Slika 5.). Proteini koji tvore antenske komplekse nisu još do kraja istraženi i svrstani su u Lhc obitelj proteina. Gotovo svi LHC polipeptidi sadrže tri transmembranske uzvojnice. Prva i treća su slično građene i izrazito su konzervirane unutar Lhc proteina (Ort i sur., 1996).



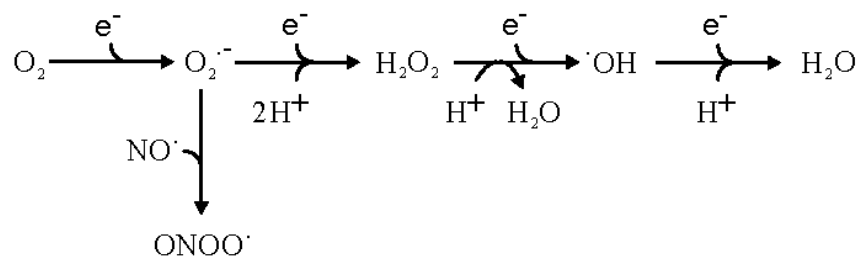
Slika 5. Građa LHCII. A) Različiti klorofili s prikazanim odgovarajućim apsorpcijskim maksimumima i veznim mjestima na proteinu. B) Karotenoidi vezani na protein i njihovi apsorpcijski maksimumi (prema Ballottari i sur., 2009).

Dinamičnim promjenama u strukturi i funkciji proteina, fotosintetske membrane biljaka mogu regulirati raspodjelu apsorbirane svjetlosne energije između korištenja u fotosintezi (qP) i fotoprotektivnog neradiacijskog otpuštanja suviška, tj. nefotokemijskog utišavanja (NPQ). Taj proces je kontroliran svojstvima cjelovite membrane,

transmembranskim pH gradijentom, organizacijom proteina LHCII i reverzibilnim vezanjem specifičnog karotenoida – zeaksantina. Njegova aktivacija je ključni događaj u regulaciji apsorpcije svjetlosne energije (Ruban i sur., 2002).

3. Karotenoidi kao zaštitni pigmenti

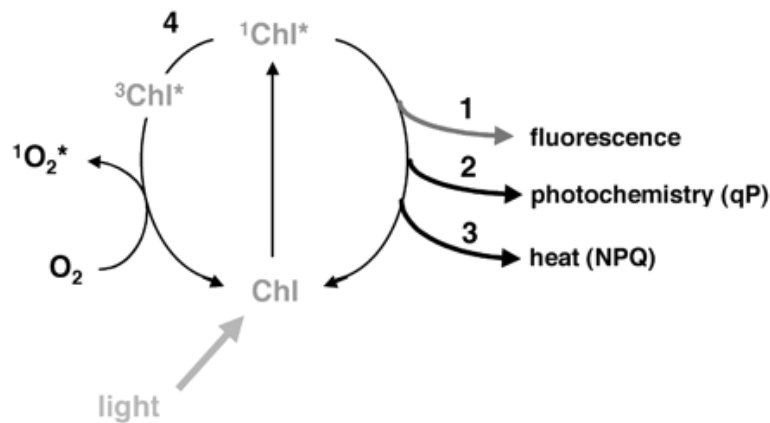
Osim uloge pomoćnih pigmenta za apsorpciju svjetlosti, karotenoidi imaju važnu ulogu u zaštiti fotosintetskog aparata. Jedinstvena raspodjela elektronskih nivoa koji su posljedica polienske strukture glavnog lanca čini karotenoide jedinim prirodnim spojevima koji su sposobni prenijeti ekscitacijsku energiju pobuđenog stanja i s karotenoida na klorofil u LHC tijekom apsorpcije svjetlosti i s tripleta klorofila ili singleta kisika na karotenoid u fotosintetskom reakcijskom centru u svrhu zaštite reakcijskog centra od fotooštećenja (Vershinin, 1999). Drugim riječima, imaju važnu ulogu kao antioksidacijski spojevi koji sprečavaju fotooksidaciju klorofila u reakcijskim centrima, bilo da sprečavaju nastajanje singletnog kisika ili njegovo štetno djelovanje. Singletni kisik spada u skupinu spojeva pod nazivom reaktivni oblici kisika (ROS). Mogu biti u obliku slobodnih radikala superoksida O_2^- i hidroksila $\cdot OH$, te u obliku vodikovog peroksida H_2O_2 i singletnoga kisika 1O_2 (Slika 6.). Uzrokuju oštećenja membranskih lipida, nukleinskih kiselina i proteina – posebice D1 podjedinice PSII na kojoj se odvija cijepanje vode na molekulu kisika i protone vodika.



Slika 6. Reaktivni oblici kisika (prema <http://herkules.oulu.fi/isbn9514266625/html/c409.html>).

Aktivnost fotosintetskog aparata se mjeri u obliku promjene fluorescencije klorofila *a* *in vivo* ovisno o načinu osvjetljavanja. Taj postupak je postupno razvijan još od 1931. kada su Kautsky i Hirsh nakon niza eksperimenata dokazali kako postoji veza između fotosintetskih reakcija i fluorescencije. Kasnije se promjene u fluorescenciji povezalo s redoks stanjem komponenti PSII i uveden je pojam „quencher“ – utišivač (http://www.chlamy.org/companion/Fluorescence_Quenching.pdf). Ovisno o načinu utišavanja fluorescencije,

razlikujemo fotokemijsko utišavanje (Q, tj. qP) i nefotokemijsko utišavanje (NPQ, tj. qN) (Slika 7.). Kada Chl apsorbira svjetlost, prelazi iz osnovnog stanja u singletno pobuđeno stanje, $^1\text{Chl}^*$ iz kojeg se vraća u osnovno stanje na nekoliko načina (Slika 7.). Razlika u energiji može se emitirati kao svjetlost (fluorescencija), može služiti za pokretanje fotokemijske reakcije ili se otpustiti u obliku topline, ili može dovesti do stvaranja tripletnog pobuđenog stanja klorofila, $^3\text{Chl}^*$ (Müller i sur., 2001).



Slika 7. Moguće sudbine pobuđenog klorofila (Chl). Kada Chl apsorbira svjetlost, prelazi iz osnovnog stanja u singletno pobuđeno stanje, $^1\text{Chl}^*$. Ima nekoliko načina povratka u osnovno stanje. Može se emitirati svjetlost, a vidimo ju kao fluorescenciju (1). Energija pobuđenog stanja može pokretati fotokemijske reakcije (2) ili se može otpustiti u obliku topline (3); oba mehanizma smanjuju količinu fluorescencije. Na kraju, $^1\text{Chl}^*$ može dovesti do stvaranja tripletnog pobuđenog stanja klorofila, $^3\text{Chl}^*$ (4). Prilikom vraćanja u osnovno stanje $^3\text{Chl}^*$ može prenijeti energiju na molekularni kisik pa nastaje vrlo reaktivni singletni oblik kisika $^1\text{O}_2^*$ (prema Müller i sur., 2001).

3.1. Fotokemijsko utišavanje

Fotokemijsko utišavanje se vrši prijenosom energije s klorofila *a* na elektrone u reakcijama fotosinteze. Ako je fotosistem prezasićen, višak energije reakcijski centri mogu prenijeti na kisik koji zatim prelazi u singletni oblik. Kako bi se to spriječilo, određeni pigmenti poput β -karotena mogu preuzeti višak energije na sebe i prijeći u pobuđeni oblik (Franki i Brudvig, 2004). Time se sprječava stvaranje ROS i omogućuje održavanje normalne razine elektrona u lancu prijenosa elektrona u kloroplastima. Osim preuzimanja viška energije s reakcijskog centra, pigmenti svojim antioksidativnim djelovanjem mogu spriječiti oštećenja uzrokovana reaktivnim oblicima kisika. Drugim riječima, pri uvjetima visoke osvjetljenosti zaštitni pigmenti u sklopu procesa fotosinteze na sebe preuzimaju višak ekscitacijske energije i uklanjaju formirane ROS.

β -katoren ima važnu ulogu u zaštiti klorofila od fotooksidacije i reaktivnih oblika kisika u sklopu fotokemijskog utišavanja. Istraživanja na fotosintetskim bakterijama pokazala su da β -karoten funkcionira kao redoks međuspoj u sekundarnim putovima prijenosa elektrona unutar PSII, te se kationski radikali karotenoida prolazno formiraju nakon fotoekscitacije bakterijskih LHC. Zbog produženog pi-elektron konjugiranog sustava molekula karotenoida, kationski radikal je delokaliziran i to omogućuje β -karotenu da funkcionira kao „molekularna žica“ (Franki i Brudvig, 2004). Preuzima energiju sa tripleta klorofila *a* pa ne dolazi do stvaranja singletnog kisika, a energija se otpušta u obliku topline.

Neki ksantofili također sudjeluju u fotokemijskom utišavanju kao antioksidansi te štite fotosistem od tripletnog oblika klorofila i singleta kiska. Primjer za to su ksantofili ketokarotenoidi. Ketokarotenoidi se rijetko javljaju u višim biljkama, ali se javljaju u algama gdje omogućavaju dodatnu zaštitu od reaktivnih oblika kisika (Jayaraj i Punja, 2008). Drugi primjer je uloga zeaksantina kao antioksidansa. Eksperimenti na mutantima su pokazali kako zeaksantin sprječava fotooksidaciju u membranama tilakoida no nije određeno da li djeluje na ROS ili sprječava lipidnu peroksidaciju (Müller i sur., 2001).

Fotokemijsko utišavanje u cijanobakterijama tek je nedavno otkriveno, a vrši ga OCP (orange carotenoid protein – narančasti karotenoidni protein). Svjetlost uzrokuje strukturalne promjene unutar karotenoida i proteina, što rezultira prijelazom iz narančastog neaktivnog oblika u crveni aktivni oblik. Crveni OCP inducira povećanje otpuštanja energije što uzrokuje smanjenje prijenosa energije s fikobilisoma cijanobakterijskih antena na reakcijske centre. (Kirilovsky, 2010). OCP je novi član obitelji „blue light-photoactive proteins” (proteini fotoaktivni pri plavoj svjetlosti). To je protein topiv u vodi na koji je vezana jedna molekula karotenoida ehinenona ili zeaksantina (Wilson i sur., 2010).

Mehanizmi zaštite PSII su bolje istraženi jer je on podložniji oksidacijskom oštećenju koje nastaje kao rezultat stresa uzrokovanog velikim intenzitetom svjetlosti, odnosno podložniji je fotoinhibiciji. Vjerovalo se kako je PSI manje osjetljiv na fotoinhibiciju i procesi njegove zaštite nisu detaljno istraživani. Novija istraživanja su pokazala da je PSI osjetljiv na veliki intenzitet osvjetljenja pri uvjetima niske temperature i kada je lanac prijenosa elektrona nepravilno balansiran. Smatralo se kako je zaštita PSI rezultat antioksidacijskih enzima te sposobnosti reakcijskog centra da višak energije otpusti u obliku topline. Tek nedavno je određena uloga LHCI kompleksa u zaštiti PSI. Korištenjem mutanata koji ne sadrže određene tipove Lhc proteina, dokazano je da antenski kompleksi imaju bitnu ulogu u zaštiti PSI od

fotoinhibicije. Nadalje, primijećeno je kako prilikom osvjetljenja visokim intenzitetom svjetlosti, za razliku od LHCI-PSII kompleksa, u LHCI-PSI kompleksu prvo dolazi do oštećenja antenskog kompleksa a ne reakcijskog centra. Mogućnost takve zaštite je vjerojatno posljedica toga što LHCI sadrži nekoliko klorofila koji apsorbiraju u crvenom dijelu spektra, tj. imaju niži energetske nivo nego svi ostali pigmenti u PSI uključujući P700 pa mogu preuzeti višak energije na sebe. Ti klorofili su prilagođeni uvjetima jake osvjetljenosti i imaju jako efikasne mehanizme oslobađanja viška energije u obliku topline. Pokusi sa mutantima koji ne sadrže „crvene“ klorofile su potvrdili njihovu važnost u kontroli količine energije u PSI (Alboresi i sur., 2009).

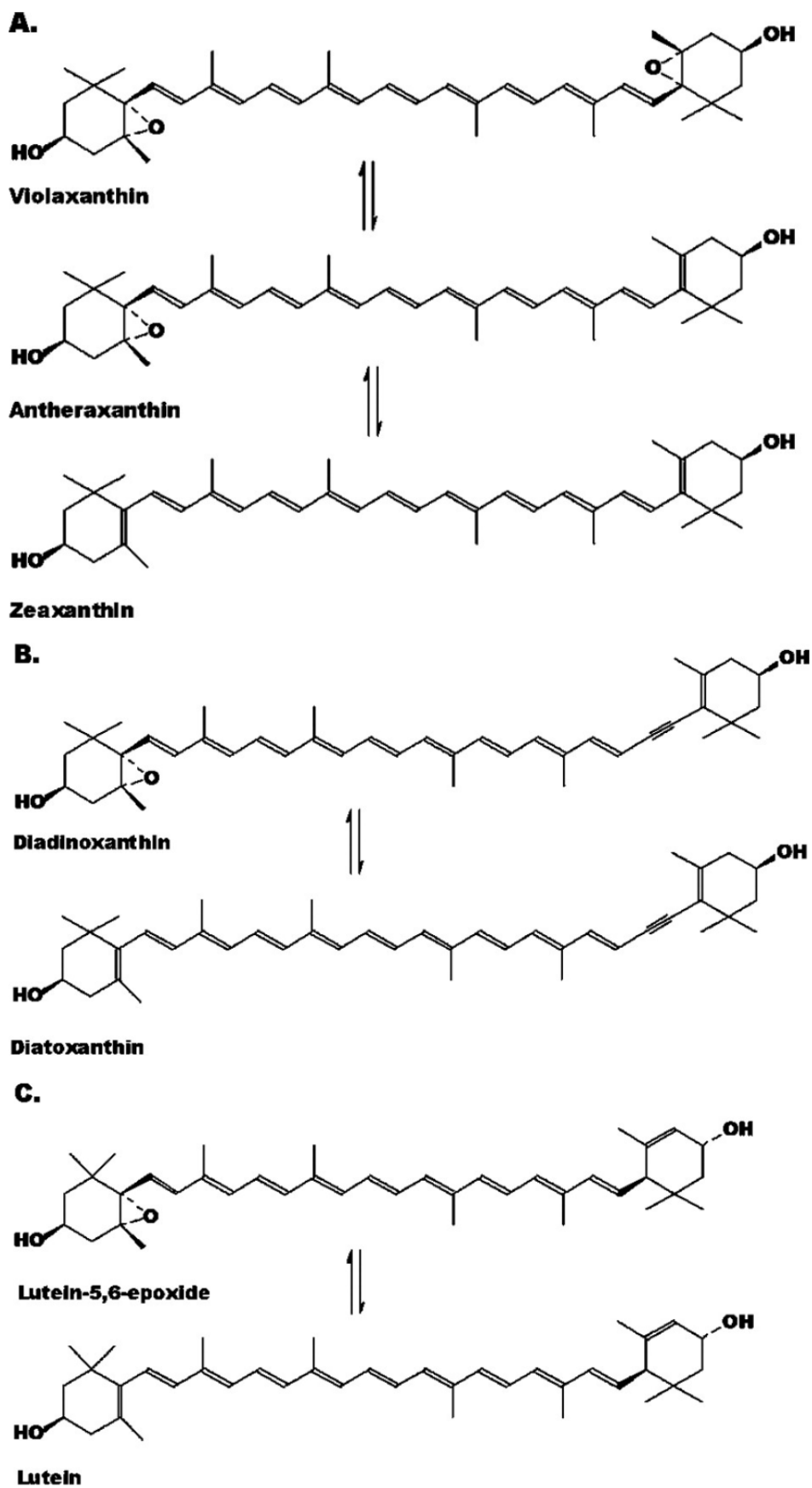
3.2. Nefotokemijsko utišavanje

Nefotokemijsko utišavanje filtrira višak energije prije ulaska u proces fotosinteze. Ovaj tip utišavanja možemo podijeliti na tri različite komponente, ovisno o brzini relaksacije u mraku nakon perioda osvjetljenosti. Najvažnija i najbrža komponenta u većini alga i biljaka je pH iliti energetske ovisna komponenta – qE. Aktivira ju stvaranje gradijenta protona na tilakoidnoj membrani, odnosno sniženje pH lumena tilakoida koje zatim aktivira ksantofilski ciklus. Druga komponenta – qT se relaksira kroz nekoliko minuta i doima se prilično nevažnom za fotozaštitu kod većine biljaka u uvjetima jake osvjetljenosti. Javlja se kao rezultata promjene u kvaliteti osvjetljenja pri normalnom intenzitetu svjetlosti i omogućuje održavanje ravnoteže u raspodjeli energije pobuđenog stanja između PSII i PSI. Ova komponenta je posljedica fenomena prijelaznog stanja, razdvajanja LHCA sa PSII (Müller i sur., 2001.). Naime ako PSII primi više svjetlosti od PSI plastokinoni postaju uglavnom reducirani i aktiviraju kinazu koja zatim fosforilira LHCI. Fosforilacija antenskog kompleksa dovodi do njegovog disociranja sa PSII i migracije po membrani budući da molekule LHCI postaju negativno nabijene i međusobno se odbijaju. Na PSII više nije asociirano toliko LHCI pa apsorbira manje svjetlosti i njegova aktivnost se smanji. S druge strane, PSI ne mijenja brzinu rada pa dolazi do povećanja količine oksidiranih plastokinona koji zatim aktiviraju fosforilazu i ona defosforilira LHCI. Defosforilirani LHCI više nisu negativno nabijeni te se ponovno asociiraju s PSII i povećava se apsorpcija svjetlosti (Buchanan i sur., 2002). Treća komponenta NPQ ima najsporiju relaksaciju i najslabije je definirana. Vezana je uz fotoinhibiciju fotosinteze i stoga je nazvana qI (Müller i sur., 2001.).

Najrašireniji način nefotokemijskog utišavanja fotosustava je ksantofilski (odnosno violaksantinski) ciklus, kao dio qE, koji se aktivira pri jakom intenzitetu svjetlosti. Temelji se na reverzibilnom prijelazu violaksantina u anteraksantin i zeaksantin u uvjetima jake osvjetljenosti. U uvjetima niskog intenziteta svjetlosti violaksantin funkcionira kao antenski pigment i prenosi energiju na klorofil *a*. S povećanjem intenziteta osvjetljenja violaksantin se deepoksidira u anteraksantin koji se deepoksidira u zeaksantin (Slika 8.). Taj proces se vraća u početno stanje kada se smanje uvjeti osvjetljenja ili kada se biljka nađe u mraku.

Osim violaksantinskog ciklusa, postoji i ciklus lutein-5,6-epoksida (Slika 8.). U parazitskoj biljci *Cuscuta reflexa* neoksantin je zamijenjen lutein-5,6-epoksidom bez utjecaja na strukturni integritet LHC. On sudjeluje u deepoksidacijskom ciklusu ovisnom o svjetlu koji je sličan deepoksidaciji violaksantina u ksantofilskom ciklusu (Bungard i sur., 1999).

Još jedan ksantofilski ciklus čini reverzibilna deepoksidacija diadinoksantina u diatoksantin (Slika 8.). On se javlja u nekim skupinama mikroalgi i tamo služi kao zaštita od fotooksidacije umjesto violaksantinskog ciklusa (Young i sur., 1997).



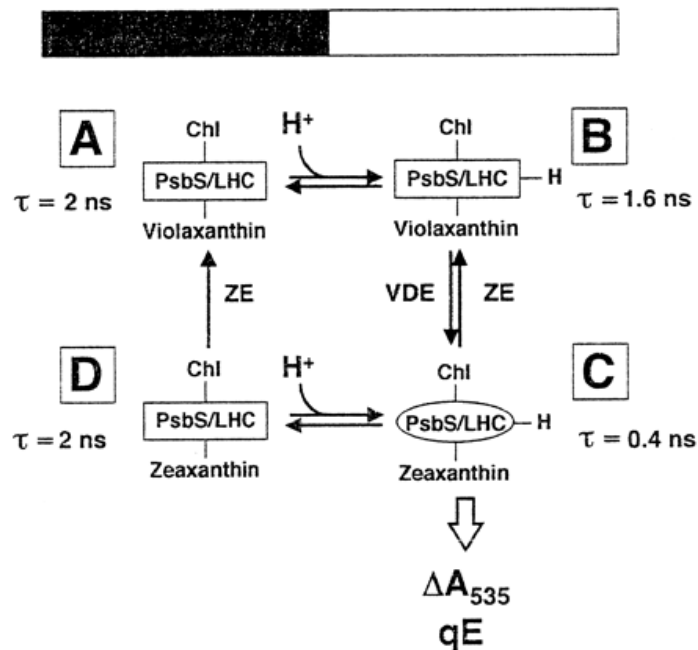
Slika 8. Violaksantinski, diadinoksantinski i lutein-5,6-epoksidni ciklus (prema Müller i sur., 2001).

Svi detalji violaksantinskog ciklusa nisu do kraja istraženi, no osnovni mehanizmi su poznati. Zeaksantin i anteraksantin zajedno s niskim pH lumena tilakoida, nastalog kao posljedica stvaranja gradijenta protona na tilakoidnoj membrani, omogućavaju bezazleno otpuštanje viška ekscitacijske energije u obliku topline izravno unutar LHC i njihov nedostatak dovodi do oštećenja fotosustava oksidacijom. Osim violaksantina, važnu ulogu u prijelazu u stanje utišavanja imaju ksantofili neoksantin i lutein, no detalji njihovih uloga nisu do kraja istraženi. Prijelaz u stanje utišavanja povezan je sa zakretanjem u konfiguraciji neoksantina, što omogućuje prijenos energije s klorofila *a* na lutein (Ruban i sur., 2007). Osim toga, eksperimentalno je dokazano da fotoprotektivna funkcija zeaksantina ovisi o prisustvu luteina u LHC (Kalituho i sur., 2006).

Budući da je proces otpuštanja viška apsorbirane energije esencijalan za adaptaciju biljaka i algi na različite uvjete osvjetljenja jer omogućuje reverzibilan prijelaz LHC iz stanja sakupljanja energije u stanje utišavanja (quenching) pri uvjetima jakog osvjetljenja, nedostatak zaštitnih pigmenta dovodi do oštećenja fotosustava. Istraživanja vršena na mutantima koji ne mogu formirati zeaksantin ili lutein pokazala su njihov utjecaj na qE. Nedostatak zeaksantina je doveo do smanjene efikasnosti nefotokemijskog utišavanja, no anteraksantin je djelomično preuzeo ulogu zeaksantina. Nedostatak luteina je također rezultirao slabijim qE. Također je utvrđeno kako dvostruki mutanti kojima nedostaje i zeaksantin i lutein ne mogu vršiti qE tip utišavanja (Müller i sur., 2001).

Koristeći podatke dobivene iz različitih istraživanja Müller i sur. (2001) razvili su primjer modela violaksantinskog ciklusa (Slika 9.). Pri jakom osvjetljenju dolazi do stvaranja neravnoteže u radu PSII i PSI zbog prezasićenosti fotosustava. To rezultira koncentriranjem protona u lumenu tilakoida i smanjenjem pH vrijednosti. Niski pH lumena tilakoida aktivira violaksantin deepoksidazu (VDE) i ona asocira s tilakoidnom membranom gdje deepoksidira violaksantin u sklopu qE dijela nefotokemijskog utišavanja. VDE koristi askorbinsku kiselinu za redukciju epoksi grupe vilaksantina, a askorbinska kiselina je prisutna u obliku kiseline samo pri niskom pH, inače je u obliku askorbata. K_m VDE za askorbinsku kiselinu tj. vitamin C također ovisi o pH. Povratnu reakciju prijelaza zeaksantina u violaksantin katalizira enzim zeaksantin epoksidaza (ZE). On je flavin adenin dinukleotid sadržavajuća, o kisiku ovisna monooksigenaza. Koristi reducirani feredoksin za epoksidaciju zeaksantina, a potom i anteraksantina. Zbog pH optimuma od pH 8, smatra se da je ZE smještena na stromalnoj strani membrane. Važan je i podatak kako je ZE konstitutivno eksprimiran, odnosno količina

ZE u stanici ostaje relativno konstantna, a za procese NPQ su ključne promjene u ekspresiji i aktivnosti VDE (Müller i sur., 2001).



Slika 9. Shematski prikaz qE. A) U limitirajućem osvjetljenju ili mraku (označava ga crna traka iznad sheme) ne odvija se utišavanje. B) Pri jakom osvjetljenju (označeno bijelom trakom) proton/i se veže na PsbS i LHC proteine. C) Nakon vezanja zeaksantina i proteina nastaje utišavajući kompleks drukčije konformacije. Prijelaz violaksantina u zeaksantin se odvija sporije nego protonacija. Nije određeno da li se zeaksantin veže u ista ili drukčija mjesta nego violaksantin. D) Nakon završetka svjetlosnog stresa, proteini PSII se brzo deprotoniraju dok je epoksidacija zeaksantina u violaksantin nešto sporija. U mraku, formacija kompleksa D iz kompleksa A nije moguća *in vivo*, no može biti umjetno potaknuta smanjenjem pH u tilakoidnom lumenu (prema Müller i sur., 2001).

Važnu ulogu u violaksantinskom ciklusu imaju i Lhc proteini LHCII kompleksa, te PsbS protein PSII. Lhc proteini čine okosnicu strukture LHCII i na sebe vežu pomoćne antenske pigmente, uključujući violaksantin, a PsbS protein je protein smješten na periferiji PSII i veza je između LHCII i PSII. Sadrži dvije aminokiseline glicina koje se protoniraju pri jako niskom pH, pa na taj način registrira ΔpH . Vjerojatno je mjesto deepoksidacije karotenoida violaksantina i mjesto na koje se zatim veže zeaksantin (Niyogi i sur., 2004).

4. Zaključak

Karotenoidi zbog svoje specifične građe imaju važnu ulogu u fotosintezi. Oni ujedno služe i za zaštitu fotosintetskog aparata i za skupljanje sunčeve energije u sklopu antenskih kompleksa, ali sam mehanizam tih procesa nije do kraja objašnjen. Kao pomoćni pigmenti imaju ulogu sakupljanja svjetlosne energije i njezin prijenos na molekule klorofila *a* u antenskim kompleksima. Zaštitna uloga se dijeli na fotokemijsko utišavanje i nefotokemijsko utišavanje. Ti procesi su većinom istraženi pomoću mutanata koji ne mogu eksprimirati određene pigmente što rezultira smanjenom otpornošću na visoki intenzitet svjetlosti. Iako mehanizmi zaštite fotosintetskog aparata nisu istraženi u detalje, razvoj suvremene tehnologije omogućuje sve bolji uvid u njih. Također se sve više pažnje posvećuje dosada pomalo zanemarenim segmentima fotosustava kao što je uloga LHC asociiranih pigmenta PSI u toleranciji na jaku osvjetljenost.

5. Literatura

Alboresi, A., Ballottari, M., Hienerwadel, R., Giacometti, G. M., Morosinotto, T. (2009.) Antenna complexes protect PSI from photoinhibition. *BMC Plant Biol* 2009, **9** (71), doi: [10.1186/1471-2229-9-71](https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-71).

Armstrong, G. A., Hearst, J. E. (1966.). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment. *FASEB J*, (10), 228-237.

Ballottari, M., Mozzo, M., Croce, R., Morosinotto, T., Bassi, R. (2009.) Occupancy and functional architecture of the pigment binding sites of photosystem II antenna complex Lhcb5. *J Biol Chem*, 284 (12), 8103-8113.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2002.) Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley & Sons, Inc, SAD.

Bungard, R. A., Ruban, A. V., Hibberd, J. M., Press, M. C., Horton, P., Scholes, J.D. (1999.). Unusual carotenoid compositionant a new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (3), 1135-1139.

Caffarri, S., Passarini, F., Bassi, R., Croce, R. (2007) A specific binding site for neoxanthin in the monomeric antenna proteins CP26 and CP29 of Photosystem II. *FEBS Lett*, 581, 4704-4710.

Frank, H. A., Brudvig, G. W. (2004.). Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochemistry*, 43 (27), 8607-8615.

García-Martín, A., Pazur, A., Wilhelm, B., Silber, M., Robert, B., Braun, P. (2008.). The role of aromatic phenylalanine residues in binding carotenoid to light-harvesting model and wild-type complexes. *J Mol Biol*, 382 (1), 154-166.

Grabowski, B., Cunningham, F. X., Gantt, E. (2001.). Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (5), 2911-2916.

Jayaraj, J., Punja, Z. K. (2008.). Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses. *Plant Physiol Biochem*, 46 (10), 875-883.

Kalituho, L., Rech, J., Jahns, P. (2006.). The roles of specific xanthophylls in light utilization. *Planta*, 225 (2), 423-439.

Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M. (2004.). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol*, 134, 824-837.

Kirilovsky, D. (2010.). The photoactive orange carotenoid protein and photoprotection in cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol*, 675, 139-159.

Liu, Z., Yan, H. Y., Wang, K., Kuan, T., Zhang, J., Gui, L., i dr. (2004.). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428 (6980), 287-292.

Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K. K. (2001.). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, 125, 1558-1566.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005.) *Lehninger Principles of biochemistry*. W.H.Freeman & Co., SAD.

Niyogi, K. K., Li, X.-P., Rosenberg, V., Jung, H.-S. (2004.) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Botany*, 56 (411), 375-382.

Ort, D. R., Yocum, C. F., Heichel, I. F. (1996.) *Advances in Photosynthesis 4, Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Ruban, A. V., Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I. H., Kennis, J. T., Pascal, A. A., i dr. (2007.). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450 (7169), 575-578.

Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B., Horton, P. (2002.). Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J Biol Chem*, 277 (10), 7785-7789.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002.) *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, SAD.

Tobias, A. V., Arnold, F. H. (2006.). Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: a model for diversification of natural product pathways. *Biochem Biophys Acta*, 1761 (2), 235-246.

Vershinin, A. (1999.). Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *BioFactors*, 10 (2-3), 99-104.

Young, A. J., Phillipa, D., Rubanb, A. V., Hortonb, P., Frank, H. A. (1997.). The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure Appl Chem*, 69 (10), 2125-2130.

Wilson, A., Kinney, J. N., Zwart, P.H., Punginelli, C., D'Haene, S., Perreau, F., Klein, M.G., Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2010.) Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria. *J Biol Chem*, 285, 18364-18375.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Carotenoid>

<http://herkules.oulu.fi/isbn9514266625/html/c409.html>

http://www.chlamy.org/companion/Fluorescence_Quenching.pdf

6. Sažetak

Fotosinteza je neophodan i izuzetno složen biokemijski proces u biljkama. Odvija se u reakcijskim centrima smještenim na tilakoidnim membranama kloroplasta. Razlikujemo dva reakcijska centra biljaka – PSII i PSI. Na PSII se stvara protonski gradijent, formira se O_2 i oslobađa se e^- koji se potom prenosi do PSI. Mehanizmi zaštite fotosustava omogućuju jednolik prijenos energije na reakcijske centre i optimalan tijek elektrona među njima. Zbog svoje građe PSII je podložan oksidaciji koja rezultira gubitkom funkcije, u čijem sprečavanju vrlo važnu ulogu imaju pomoćni i zaštitni pigmenti poput karotenoida. Karotenoidi se javljaju već kod prvih bakterija i prisutni su u svim carstvima, u fotosintetskim i u nefotosintetskim organizmima. Karotenoidi, klorofili i proteini zajedno tvore antenske komplekse koji služe za sakupljanje svjetlosne energije i njezin prijenos na reakcijske centre. Kao dio antenskih kompleksa, karotenoidi imaju ulogu pomoćnih pigmenta za sakupljanje svjetlosne energije i njezin prijenos do klorofila *a* te ulogu zaštitnih pigmenta koji sprečavaju oksidaciju reakcijskog centra. Naime, zbog građe u obliku linearnih organskih molekule s višestruko konjugiranim dvostrukim vezama, π konjugirane strukture, mogu prenositi energiju koju apsorbiraju do molekula klorofila *a* u reakcijskom centru ili preuzeti višak energije s reakcijskog centra, te zahvaljujući antioksidativnom djelovanju mogu spriječiti oštećenja uzrokovana reaktivnim oblicima kisika na reakcijskom centru i tilakoidnim membranama. Važnu ulogu u zaštiti od oštećenja fotosistema oksidacijom ima ksantofilski ciklus čije su komponente poznate ali nedostaje cjelovit biofizički mehanizam.

7. Summary

Photosynthesis is a vital and complex biochemical process that occurs in the reaction centers of the chloroplast thylakoid membranes in plants. There are two reaction centers – PSII and PSI. PSII establishes proton gradient, creates oxygen and releases electrons that are subsequently transferred to PSI. Photosystem protection mechanisms allow a balanced energy transfer between reaction centers and an optimal electron flow. Due to its built PSII is susceptible to oxidation that leads to a loss of function. Accessory and protective pigments such as carotenoids have a great contribution in stopping oxidation. Carotenoids were first developed in early bacteria and now they are present in all domains, both in photosynthetic and non-photosynthetic organisms. Carotenoids, chlorophylls and proteins together form antenna complexes that are used to harvest light and transfer its energy on the reaction centers. The role of carotenoids in antenna complexes is that of accessory pigments harvesting energy and transferring it on chlorophyll *a* molecules. Besides being accessory pigments, as protective pigments they have a role in protecting reaction centers from oxidation. Due to their linear molecular structure that contains multiple conjugated double bonds, called pi-conjugated system, they can either transfer absorbed energy toward chlorophyll *a* reaction center molecule or accept excess reaction center energy. They can also stop the damage from reactive oxygen species on reaction centers and thylakoid membranes due to their antioxidative abilities. Protection from oxidative damage of photosystem is mainly provided by xanthophyll cycle. Main components of the cycle are quite known but the actual biophysical mechanism is not yet derived.