

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék



A kloroplasztisz vas-kelát-reduktáz aktivitása
Országos diákköri dolgozat

Készítette:

Müller Brigitta
biológia-környezettan szakos hallgató

Témavezetők:
dr. Fodor Ferenc és Solti Ádám

2012.
Budapest

Tartalomjegyzék

Bevezetés	0
Anyag és módszer.....	11
Növénynevelés.....	11
Kloroplasztisz belső burkolómembrán izolálás.....	12
SDS-PAGE és Western blotting	13
Kloroplasztisz burkolómembrán vezikulumok vas ^(III) -kelát-reduktáz aktivitásának mérése	14
Enzimkinetika számítása	15
Iontartalom vizsgálatok	15
Fluoreszcencia indukció mérés.....	16
Eredmények.....	18
Iontartalom mérés	18
Fluoreszcencia indukció mérés.....	19
A kísérletekben felhasznált membránok tisztasága	19
Vas-kelát redukció mérések.....	20
Diskusszió.....	23
Összegzés.....	27
Köszönetnyilvánítás	28
Irodalomjegyzék.....	29

Bevezetés

A vas a növények fejlődéséhez elengedhetetlenül szükséges, ún. esszenciális tápelem. A vas központi jelentősége annak tulajdonítható, hogy képes fehérjékhez koordinálódni és képes elektronokat felvenni, ill. leadni, donorként és akceptorként is viselkedni, ezért fontos kofaktorként szolgál sok enzim számára, főleg amelyek szerepet játszanak a fotoszintézisben, a légzésben, a DNS-bioszintézisben, és a nitrogén-anyagcserében. Annak ellenére, hogy rendkívül fontos a megfelelő mennyiségű jelenléte, a vas toxikus is lehet, ha túl nagy mennyiségben halmozódik fel. Ennek az az oka, hogy a szabad vas Fenton-reakcióban vesz részt, és citotoxikus hidroxil gyököket képez. (Winterbourn, 1995). A sejtben ugyanis különböző folyamatok eredményeként reaktív oxigénformák (ROS) képződése figyelhető meg (pl. a kloroplasztiszban vagy mitokondriumban megtalálható elektrontranszportlánc működésének eredményeképpen). A ROS közül a szuperoxid anion gyökök ($O_2^{\cdot-}$) csak igen rövid ideig képesek létezni, mivel a felesleges elektronjuk miatt reakcióba léphetnek az élő szervezetet alkotó szerves vegyületekkel. A $O_2^{\cdot-}$ (enzimatis, szuperoxid diszmutáz – SOD – katalizált) diszproporcionálódásával H_2O_2 és O_2 keletkezik. A keletkezett H_2O_2 jóval nagyobb stabilitással rendelkező, tehát kevésbé reaktív ROS, azonban Fenton-reakciókban vehet részt. Ennek lényege, hogy Fe^{2+} ionok jelenlétében H_2O_2 -ből rendkívül agresszív, nagy reakciósebességű hidroxilgyökök keletkeznek (a H_2O_2 , a fémtől egy elektront kap, aminek következtében a H_2O_2 hidrolizál, egy hidroxil ionra (OH^-) és egy hidroxil gyökre ($OH^\cdot$) esik szét, amely ellen nincs közvetlen enzimatis védekezés, és amely gyök rendkívül erős oxidálószerként viselkedik organikus molekulákkal szemben. Ezért a növényi szervezeten belül a vas szabadon nem, csak szerves molekulákkal komplexet alkotva, vagy kelátok formájában lehet jelen. A növények, hogy elkerüljék a vas Fenton-reakciókban való részvételét, erőteljesen szabályozzák a vas felvételét és szállítását.

A növényi sejtekbe felvett vas 80-90 %-át a kloroplasztiszok tartalmazzák (Terry *et al.*, 1986; Morrissey *et al.*, 2009). A növényekben a vas esszenciális a fotoszintézishez, a klorofill bioszintézishez és más esszenciális anyagcsere-folyamatokhoz. A kloroplasztiszokban a fő vastartalmú fehérjék a Fe-S fehérjék (pl. PSI) és hem kofaktorokat kötő enzimek (pl. aszcorbát-peroxidáz) (Balk *et al.*, 2005; Briat *et al.*, 2007). A plasztiszokban ferritin jellegű vaskötő proteinek is találhatók (Briat *et al.*, 2010a), jelenlétük azonban csak fiatal levelek differenciálatlan plasztiszjaiban, illetve stressz-körülmények között mutatható ki (Briat *et al.*,

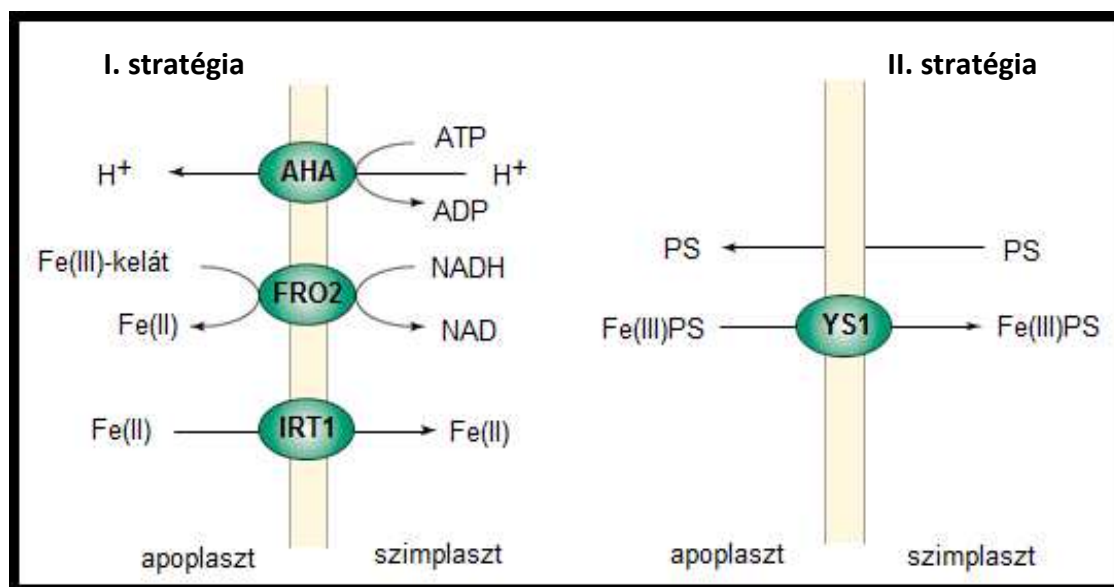
2010b). A ferritinek nagy mennyiségű vasat képesek felhalmozni Fe-OH formában. A kloroplasztiszok vastartalmának kisebb részét a fehérje kofaktorként jelenlévő önálló vas ionok teszik ki, pl. a PSII reakciócentrum-protenjein és a SOD-ban (McMaster és Oganessian, 2010).

A vas nemcsak a fejlődéshez esszenciális, hanem a növényi életfunkciók működéséhez is nélkülözhetetlen. Vashiány hatására a növény súlyos hiánytüneteket mutat, vagyis klorózis alakul ki, ami a levelek sárgulásában nyilvánul meg, és a klorofill szintézis vas-függéséhez köthető (Abadía *et al.*, 2011). Tehát a klorofill bioszintézis és a vas-kén fehérjék, mint pl. a pigment proteinek összeszerelődése a tilakoidmembránokban vashiány hatására erősen gátlődik, ami a növény fotoszintetikus aktivitásának és produktivitásának csökkenéséhez vezet (Andaluz *et al.*, 2007). Ezen kívül a vasra szükség van az oxidatív stressz elleni védelemben résztvevő vastartalmú fehérjék képződéséhez is.

Bár a talajokban általában az összes vastartalom jelentősen meghaladja a növények szükségleteit, a ténylegesen felvehető (oldható formában jelen lévő) vas mennyisége a vas-oxidok, hidroxidok széles pH tartományban fellépő rossz oldódása miatt csekély. A növények kétféle stratégiát fejlesztettek ki a vas felvételére (Römheld, 1987). Az I. stratégiát követő növények (kétszikűek és a fűfélék kivételével az egyszikűek) a vasat a plazmamembrán felületén redukálják, majd a képződött Fe^{2+} -t transzportálják a sejt citoplazmájába. Ezt megelőzi egy protonleadási lépés: vashiányos körülmények között a stratégia I. növények protont adnak le a rizoszférába, ezzel csökkentik a talajoldat pH-ját és növelik a Fe^{3+} oldhatóságát. Ugyanis egy egységnyi pH csökkenés a Fe^{3+} oldhatóságát 1000-szeresére növeli (Olsen *et al.*, 1981). A folyamatért felelős proton ATP-áz az AHA család (*Arabidopsis* H^+ -ATP-áz) tagja és vashiány hatására fokozott mértékben jelen van a gyökér plazmamembránjában. (Santi *et al.*, 2005; Santi *et al.*, 2008; Santi *et al.*, 2009; Dell'Orto *et al.*, 2000). A II. stratégiát követő növények (fűfélék) speciális, Fe^{3+} komplexálására képes vegyületeket (fitosziderofórokat) szintetizálnak és adnak le a rizoszférába, majd az így képződő $\text{Fe}^{(\text{III})}$ - fitosziderofór komplexeket transzportálják a membránon keresztül (Jeong és Connolly, 2009; Römheld és Marschner, 1986).

Stratégia I. növények vASFelvételeben esszenciális a talaj vastartalmának a redukálása, hiszen e stratégiát követő növények szabad Fe^{2+} -t tudnak felvenni. A gyökér felszínén a talaj vastartalmának $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ -vé redukálásában egy membránkött vas-kelát oxidoreduktáz (FRO2) vesz részt. A FRO2 expressziója vashiány hatására erőteljesen fokozódik a

gyökerekben (Wu *et al.*, 2005). A vasfelvételi rendszer működése során először a kelátokban kötött Fe^{3+} redukálódik a FRO2 segítségével, majd a szabad Fe^{2+} -t a gyökér felveszi az IRT1 (iron-regulated transporter) segítségével (Guerinot, 2000). Stratégia II. vasfelvétel során a $\text{Fe}^{(III)}$ -fitosziderofór komplexeket a gyökér egy transzporter segítségével veszi fel, amely a YSL családhhoz (Yellow Stripe) tartozik, és a kukorica YS1 fitosziderofór-transzporteréről nevezték el (Curie *et al.*, 2009). Az YSL transzporterek közül az YSL1 kukorica (*Zea mays*) levélben, míg az YSL2 az *Arabidopsis* gyökerek endodermiszének periciklus-sejtjeiben expresszálódik és plazmamembránjában lokalizált (Schaaf *et al.*, 2005) (1. ábra). A fűfélék ezen kívül a Fe^{2+} -t is fel tudják venni a stratégia-I. útvonalon keresztül (Cheng *et al.*, 2007 és Ishimaru *et al.*, 2006), azonban vashiányos környezetben nem figyelhető meg proton ATP-áz aktivitás vagy vas-kelát reduktáz aktivitás növekedése, mint a stratégia-I. növények esetén.

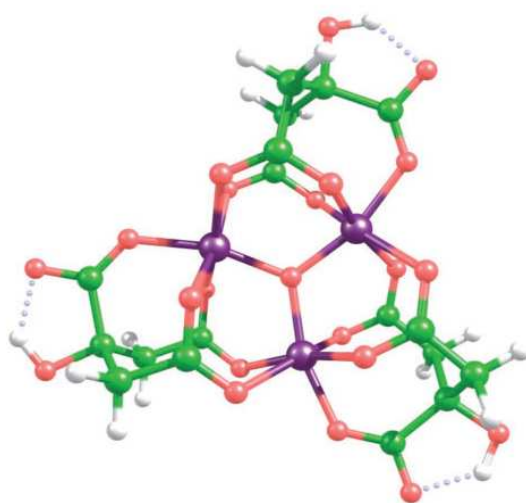


1. ábra: A magasabbrendű növények vasfelvételi mechanizmusai. Stratégia I. növényekben (pl. *Arabidopsis*, borsó, paradicsom) a $\text{Fe}^{(III)}$ -kelátok redukálódnak, mielőtt a $\text{Fe}^{(2+)}$ a plazmamembránon felvevődne. A stratégia II. növények (pl. árpa, kukorica, rizs) fitosziderofórokat (PS) bocsátanak ki, majd a $\text{Fe}^{(III)}$ -fitosziderofór komplexeket transzportálják a plazmamembránon keresztül. (Forrás: Schmidt, 2003)

Bár a gyökérbe történő vasfelvétel mechanizmusa egyre részletesebben ismert, a vas transzlokációja, így a xilémelemek vasfelvételi folyamata még kevésbé feltárt. Egyes elképzelések szerint szerepe lehet ebben a folyamatban az IREG1 (Iron-Regulated)

transzporternek (Kim és Guerinot, 2007), de YSL közvetítette Fe-NA transzport is elképzelhető (Abadía *et al.*, 2011).

Ahhoz, hogy a növény kivédje a vas toxikus hatásait, a szabadon lévő vas szállítására kelátokat használ, pl. citrátot és nikociánamint (Curie *et al.*, 2009; Haydon és Cobbett, 2007). Attól függően, hogy a növény milyen vas-kelát komplexet használ, különböző szállítási rendszerek vesznek részt a vas növényen belüli elosztásában. A xilém könnyezési nedvben a vas leggyakoribb formája a $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -citrát (**2. ábra**), tehát a citrát részt vesz a vas hosszú távú transzportjában (a gyökérből a szárba) (Rellán-Álvarez *et al.*, 2009)



2. ábra: A xilémbe a vas elsősorban Fe_3Cit_3 komplex formájában szállítódik. Az ábrán a molekulát alkotó atomokat különböző színnel jelöltük (vas: lila, oxigén: piros, szénatomok: zöld, hidrogén: fehér). (Forrás: Rellán-Álvarez *et al.*, 2009)

A citrát xilémbe történő betöltéséért az FRD3 (ferric reductase defective) felelős, amelynek ezáltal szintén szerepe van a vas transzlokációjában (Durrett *et al.*, 2007). Az FRD3 a periciklus és a szállítószövetek sejtjeinek membránjaiban lokalizálódik. A nikociánamin egy nem fehérjeépítő aminosav, szerkezetileg a fitosziderofórokhoz hasonló, amely a Fe^{3+} -t és a Fe^{2+} -t is kelálni tudja a floémbe intercelluláris transzportra (Curie *et al.*, 2009). Minden növény szintetizál és használ NA-t, függetlenül az alkalmazott vaskészlet felvételi stratégiától. Azok a mutánsok, amelyek nem képesek ezeket a kelátorokat megfelelően előállítani vagy szállítani, azok vashiányos fenotípusúak lesznek (Briat *et al.*, 2007).

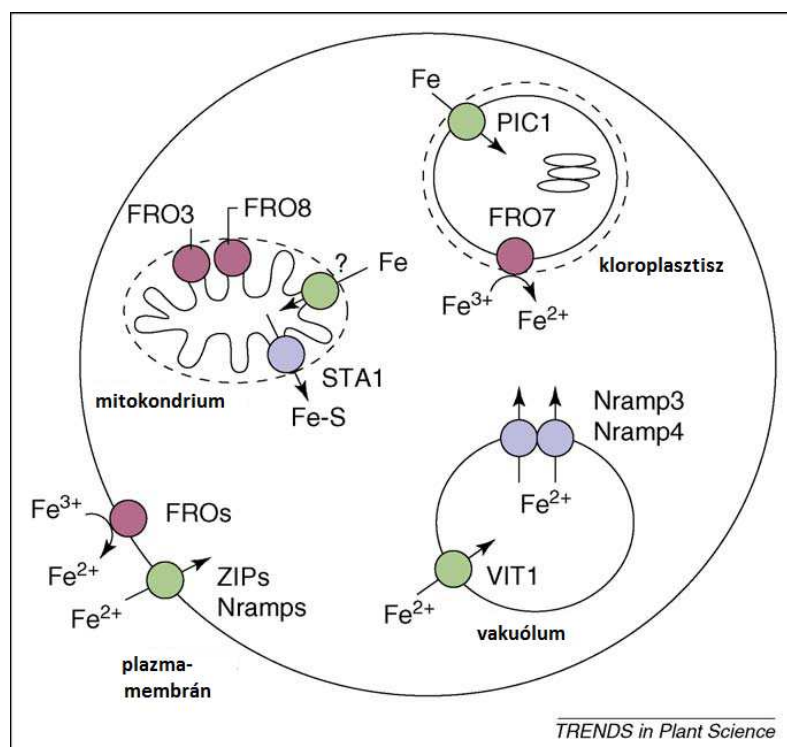
A YSL család (az Arabidopsis OPT (oligopeptid transzporter) család alcsaládja) tagjairól azt feltételezik, hogy a NA-fém komplexek transzport fehérjéi. *Arabidopsis*-ban 8 YSL van és a feltételezett funkcióikat nemrégiben kezdték feltárni. A YSL1 és YSL3 a fémek mobilizációjában vesz részt, beleértve a vasat is, a levelekből a reproduktív szervekbe, magokba (Waters *et al.*, 2006).

Jóllehet a vasszabályozási mechanizmusok genetikai háttere, a vasszabályozás egyre részletesebben ismert, a vas sejtfalban történő megkötése, a plazmamembránon keresztüli transzportot követő további folyamatok részleteiben máig nem tisztázottak. A mezofillum sejtjei Fe^{2+} és Fe^{3+} ionokat is fel tudnak venni (Nikolić és Römheld, 2007), de legalább a Fe^{3+} ionok egy részének redukálnia kell, FRO (Ferric Reductase Oxidase) reduktázok segítségével, hogy hatékony legyen a vasszabályozás (Jeong *et al.*, 2008). A vas általában oldhatatlan formában van jelen a növényi szövetekben, ezért a kelátorok és transzporterek mellett a vas reduktázok aktivitása is fontos, a vas hatékony elosztásában. A vas-citrát komplexek redukciójában a levél mezofillum-sejtjei által expresszált FRO6-nak tulajdonítanak szerepet (Jeong és Conolly, 2009). A redukált vasat nagy valószínűség szerint a ZIP-családba tartozó vastranszporterek veszik fel a plazmalemmán keresztül, azonban nem zárható ki $\text{Fe}^{(II/III)}$ -NA komplexek felvétele sem (Briat *et al.*, 2007, Abadía *et al.*, 2011).

Bár néhány vas-transzportban résztvevő fehérjét már azonosítottak, de sejtben belüli szállítási mechanizmusokról még viszonylag keveset tudunk. A vakuólumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a vasraktározásban és a vas növényi sejtéből való elvonásában, különösen a csíranövény fejlődéséhez esszenciálisak (Lanquar *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006). A vakuólum vastranszportere (VIT1) a vakuólumba importálja a vasat (Kim *et al.* 2006), az NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) család 2 fém transzportere, NRAMP3 és NRAMP4 pedig a vas felvételében és leadásában is szerepet játszanak és kulcsfontosságúak a csíranövény fejlődésében alacsony vastartalmú környezetben. (Lanquar *et al.*, 2005)

A mitokondriumokra, a kloroplasztiszokhoz hasonlóan, nagy vasigény jellemző. Felhasználják a vasat a légzési elektrontranszportláncban kofaktorként és jelenléte a vas-kén csoportok összeszereléséhez is szükséges. A növényi mitokondriumok vas-transzporterei kevésbé ismertek, de azt már tudjuk, hogy a felvételben fontos szerepet játszik a burkolómembránban elhelyezkedő FRO3 és FRO8 vas-kelát reduktáz enzim (Heazlewood *et al.*, 2004), ami azt mutatja, hogy a vas-kelát reduktázok részt vesznek a mitokondrium vas transzportjában is. A közelmúltban azonosították az első, mitokondriális vasszabályozást

szerepet játszó transzportert (MIT: Mitochondrial Iron Transporter, Bashir *et al.*, 2011) (3. ábra).

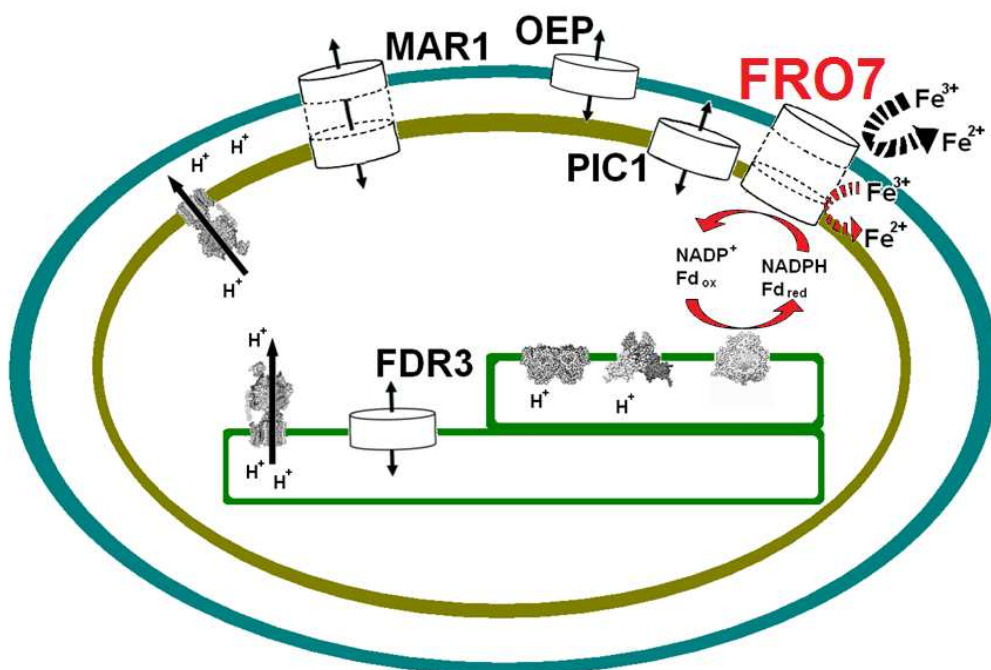


3. ábra: A növényi sejt vastranszportjában részvevő molekuláris komponensek. A plazmamembránban $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -kelát reduktázok, az Nramp és ZIP család transzporterei vesznek részt a vasszorbálásban. A három legfontosabb sejtalkotó, amelyek kulcsfontosságúak a vas homeosztázisban: a kloroplasztisz, mitokondrium és vakuólum. Bár a mitokondrium vas importterét (MIT) nemrégiben azonosították, ez nincs feltüntetve az ábrán, a vas-kén csoportok exportálása pedig a STA1 és vas-kelát reduktázok (mint pl. FRO8 és FRO3) segítségével történik. A vakuólumba a vasat a VIT1 veszi fel, a leadásban pedig az Nramp3 és Nramp 4 vesz részt. A kloroplasztisz vasszorbálásáért a PIC1 és egy vas-kelát reduktáz felel. (Forrás: Jeong és Guerino., 2009)

A kloroplasztiszba történő vasszorbálás részleteiben még nem ismert, de azt már tudjuk, hogy a folyamathoz esszenciális egy vas-kelát-reduktáz enzim jelenléte, amelynek segítségével történik a $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -kelátok redukciója szolubilis (oldható) Fe^{2+} ionná.

Az elsőként megtalált fehérje, ami részt vesz a vasszorbálásban a kloroplasztiszba a PIC1/TIC1 (Permease In Chloroplast 1 vagy Translocon of Inner Chloroplast Envelope 21), amit *Arabidopsis*-ban azonosították, a kloroplasztisz belső membránjában lokalizálódik, és kritikus fontosságú a kloroplasztisz fejlődésében. Nemrégiben írták le az FRO7 nevű vas-kelát-

reduktázt (*Arabidopsis thaliana* növényekből), ami szükséges a növény vashiányos környezetben való túléléséhez. *Arabidopsis fro7* deléciós mutánsokban 75%-kal csökkent a vas-kelát-reduktáz aktivitás és 33%-kal kevesebb vasat tartalmaztak, mint a vad típusúak, ami azt bizonyítja, hogy az FRO7-nek fontos szerepe van a kloroplasztisz vasszabályozásában (Jeong és Gueriot 2009) és azt is sikerült kimutatni, hogy ennek a hiányában a kloroplasztisz nem tudta összegyűjteni a vasat a citoplazmából (Jeong *et al.* 2008). De a FRO 7 pontos helye még nem ismert. A MAR1 egy antibiotikum transzporter (Multiple Antibiotic Resistance 1) és feltehetőleg a Fe-NA komplexeket szállítja a kloroplasztiszba (Conte *et al.*, 2009; Conta *et al.*, 2010). Az OEP a külső burkolómembrán porinjait jelenti; ezek olyan, több proteínláncból felépülő póruskomplexek, amelyek szelektivitásuk révén csak jól meghatározott, OEP-típusra jellemző anyagokat engednek át a külső burkolómembránon. Az FDR3 a tilakoidokban lokalizálódik és szintén szerepe van a vas anyagcserében (4. ábra).

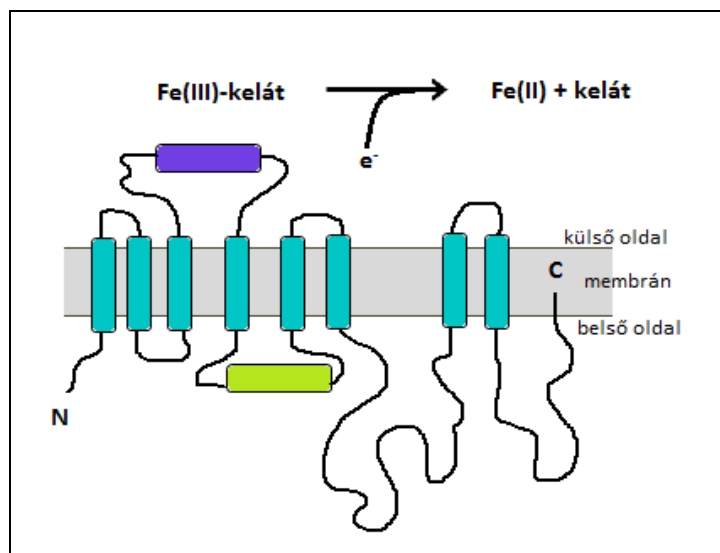


4. ábra: A kloroplasztisz vastranszportja részletesebben: A FRO7 pontos helye még nem ismert, a PIC1 a belső membránban lokalizált, a MAR1 és az OEP-ről feltételezik, hogy részt vesznek a vas szállításában, az FDR3 pedig a tilakoidmembrán szállítófehérjéje.

A FRO családnak *Arabidopsis*-ban 8 tagja ismert szekvencia alapján. A FRO gének különbözőképpen fejeződnek ki különböző a szövetekben, például a FRO2 specifikusan csak a gyökérben, míg a FRO6, FRO7 és FRO8 specifikusan csak a zöld növényi szövetekben expresszálódik (Mukherjee *et al.*, 2006 és Wu *et al.*, 2005). A FRO3 alacsony vaskoncentrációk esetén indukálódik mind a gyökérben, mind pedig a szárban. A FRO1 és FRO4 csak kismértékben expresszálódik a növény bizonyos részeiben. A FRO fehérjéről azt is kimutatták, hogy a különböző sejten belüli kompartmentumok membránjában is megtalálhatók (Heazlewood *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2006 és Wu *et al.*, 2005). A FRO család minden tagjának specifikus szerepe van a különböző szervekben vagy sejtalkotókban (vagyis a redukció alapú vastranszportot nem a gyökér plazmamembrán limitálja).

A FRO család a transzmembrán elektrontranszportot megvalósító flavocitokrómok szupercsaládjába tartozik és ezekre az enzimekre az jellemző, hogy elektront képesek leadni a plazmamembránon keresztül, hogy a vas-kelátokat redukálják. Ehhez 2 transzmembrán doménhez kötött hem csoportot használnak (Robinson *et al.*, 1999). A protein 8 transzmembrán domént tartalmaz és egy nagy citoplazmatikus loopot, amelyen a kofaktorok kötőhelyei találhatók (NAD, FAD), amelyek az elektront felveszik és továbbítják (Schagerlőf, 2006).

A FRO7 enzim szerepe a kloroplasztisz vASFelvételben egyértelműen bizonyított (Jeong *et al.*, 2008), a *fro7* funkcióvesztéses mutáns növényekből izolált plasztiszok vas-kelát reduktáz aktivitása és vastartalma lecsökkent és a fotoszintetikus komplexek módosultak, amely egyértelmű genetikai bizonyítékot nyújt arra, hogy a plasztiszok részben redukációs vASFelvételi stratégiát alkalmaznak. A FRO7 a citoplazmában lévő $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -kelátokat redukálja, így a vas felvehetővé válik a plasztisz számára. A redukcióhoz elektrondonorként nukleotid kofaktorokat használ. Az még kérdéses, hogy az elektrondonor NADPH vagy NADH, a dolgozatomban többek között ezt is vizsgáltam. A felvett elektron flavin és hem csoportok segítségével transzportálódik egyik oldalról a másikra, ahol a vas redukciója történik (5. ábra).



5. ábra: A vas-kelát reduktáz (FRO7) sematikus doménszerveződése.

A redukált vasat ezután a kloroplasztisz felveszi egy -belső membránjában elhelyezkedő-transzporter segítségével, a folyamatot *in vitro* detektálták belső burkolómembrán vezikulákkal (Shingles *et al.*, 2002). Természetes körülmények között a kloroplasztisz vas-kelát-reduktáz aktivitás elvesztése (a FRO7 mutációja) nem letális, és az is lehetséges, hogy a kloroplasztiszok olyan útvonalakat alkalmaznak, amelyekkel mind a Fe^{2+} , mind pedig a Fe^{3+} iont fel tudják venni (Jeong *et al.*, 2008). Mindkét felvételi útvonalat megfigyelték a cianobaktériumban, amely a kloroplasztisz „elődjének” tekinthető (Katoh, 2001).

A FRO fehérjék jelenlétét nemcsak *Arabidopsis*-ban írták le, de cDNS könyvtárak alapján más fajokban is, mint pl. szálkaperje (*Brachypodium distachyon*), uborka (*Cucumis sativus*), lucerna (*Medicago truncatula*), rizs (*Oryza sativa*), borsó (*Pisum sativum*), nyárfa (*Populus trichocarpa*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*), szőlő (*Vitis vinifera*), kukorica (*Zea mays*) is prediktálták. Ennek alapján feltételezzük, hogy bár a *Fro* gének jelenlétét és expresszióját elsősorban az *Arabidopsis*-ban vizsgálták, a magasabbrendű növényekben a vas-kelát reduktáz felépítése és működése valószínűleg hasonló.

A rendelkezésre álló ismeretek tükrében dolgozatomban így azt vizsgáltam, hogy a kloroplasztiszban a vas-kelát-reduktáz enzim (FRO7) pontosan hol lokalizálódik, milyen enzimatisms tulajdonságokat mutat, illetve hogyan változik meg a működése vashiány hatására.

Anyag és módszer

Növénynevelés

Cukorrépa növényeket 14/10 h fény [$120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]/sötét periódusok, 24/22°C hőmérséklet és 70/75% páratartalom mellett, módosított 1/4-es Hoagland tápoldaton (1,25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,25 mM KNO_3 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM KH_2PO_4 , 0,25 mM NaCl , 0,08 μM CuSO_4 , 4,6 μM MnCl_2 , 0,19 μM ZnSO_4 , 0,12 μM Na_2MoO_4 , 11,56 μM H_3BO_3 , 10 μM $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -citrát vasforrás mellett), neveltük. Vashiány előidézésére ($-\text{Fe}$) a $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA vasforrás mellett előnevelt növényeket vasmentes, 0,5% (w/v) CaCO_3 -t tartalmazó tápoldaton neveltük. Intakt kloroplasztisz izoláláshoz a növényeken a kezelés három hete alatt fejlődött homogén megjelenésű összes levelet felhasználtuk.



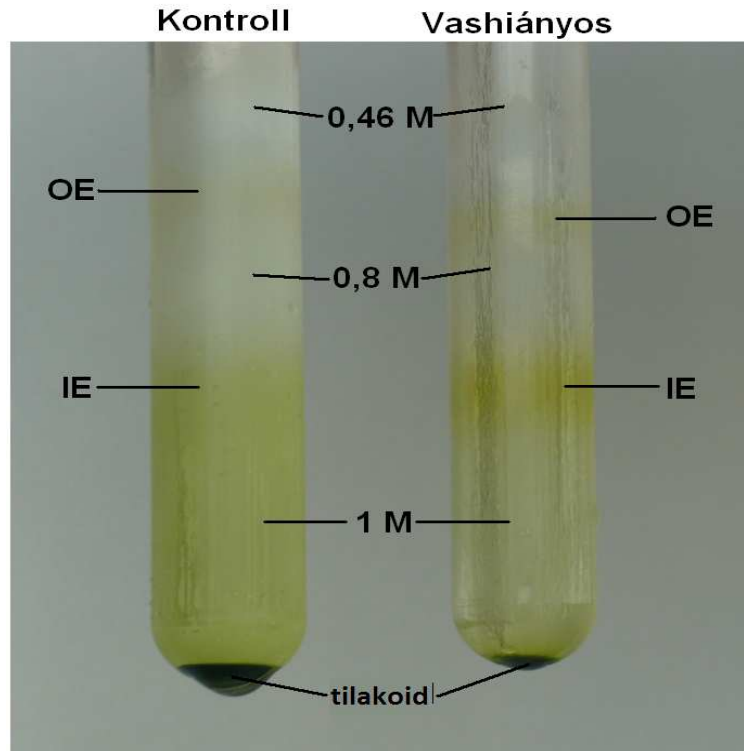
6. ábra: Intakt kloroplasztisz izoláláshoz kontroll nevelt cukorrépa növények, a növénynevelés indításakor (balra) és 3 hónapos kezelés után (jobbra). A kísérleti növényeket vízkultúrában, tehát szabályozott tápanyagellátás mellett, klímakamrában neveltük.

Kloroplasztisz belső burkolómembrán izolálás

Főerüktől megfosztott cukorrépa leveleket izoláló pufferben (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0,1% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Na-aszkorbát) homogenizáltunk 2×3 s időtartamon át Waring blendor homogenizátorral. A homogenátumot 4 réteg géz és 2 réteg Miracloth™ (Calbiochem-Novabiochem, USA) segítségével szűrtük, majd a plasztiszokat 1500×g, 5 min centrifugálással kilendülő rotorban (Sigma 11133) kiülepítettük. A plasztisz pelletet mosópufferben (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl_2) mostuk. A mosópufferből a plasztiszokat 2400×g, 5 min centrifugálással kiülepítettük és 0,6 M szacharózt tartalmazó 10 mM Tricin-KOH, pH 7,8, 2 mM EDTA pufferben (TE) vettük fel. A plasztisszuspenziót ezután 3 -20 °C törés/0 °C felolvasztás ciklus segítségével törtük.

A törött plasztiszokat tartalmazó szuszpenziót TE-pufferrel háromszorosára hígítottuk (0,2 M szacharóz koncentrációra), majd egy órán át jégen állni hagytuk. A tilakoidokat kilendülő rotorban (Sigma 11133) 4500×g, 15 min centrifugálással távolítottuk el. A felülúszóból 22 000 rpm (25 000 g_{av}), 65 min ultracentrifugálással Beckmann SW40Ti rotorban ülepítettük ki a nyers burkolómembrán frakciót. A pelletet 0,2 M szacharózt tartalmazó TE-pufferben reszuszpendáltuk és diszkontinuus cukorgradiensre rétegeztük, ahol a gradiens lépcsőit 5 mL 1,0 M szacharóz ($\rho=1,13 \text{ g mL}^{-1}$), 3 mL 0,8 M szacharóz ($\rho=1,10 \text{ g mL}^{-1}$), 2 mL 0,46 M szacharóz ($\rho=1,06 \text{ g mL}^{-1}$) és 2 mL, mintát is tartalmazó 0,2 M szacharóz ($\rho=1,03 \text{ g mL}^{-1}$) alkotta. Minden lépcsőtag TE-pufferben oldott szacharózból készült. A burkolómembrán-vezikulákat és a tilakoid szennyeződést 35 000 rpm (140 000 g_{av}), 135 min ultracentrifugálással Beckmann SW40Ti rotorban választottuk szét egymástól.

A belső burkolómembrán-frakciót az 1,0|0,8 M szacharóz gradienshatárról gyűjtöttük, majd a burkolómembrán-vezikulumokat 25 000 rpm (40 000 g_{av}) 75 min ultracentrifugálással ülepítettük ki. A kiülepített burkolómembránokat 0,2 M szacharózt tartalmazó TE-pufferben vettük fel, nagyjából 4-8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ proteinkoncentrációval.



7. ábra: A külső és belső burkolómembrán frakciók elválasztása szacharóz-gradiensben (a gradienstagok szacharóz-koncentrációját jelöltük az ábrán). OE: külső burkolómembrán, IE: belső burkolómembrán.

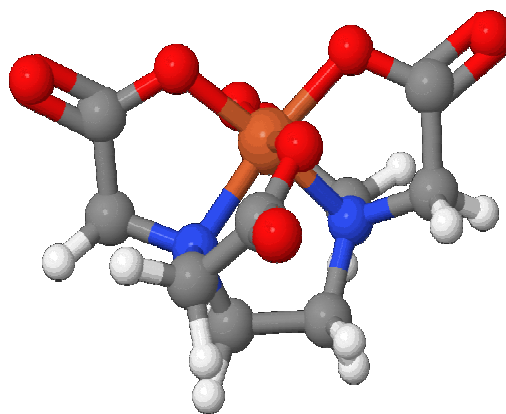
SDS-PAGE és Western blotting

Az izolált burkolómembrán-fehérjéket 62,5 mM Trisz-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 2% DTT, 10% glicerín és 0,001% brómfenolkék jelenlétében 30 min ideig szobahőmérsékleten szolubilizáltuk, majd SDS-PAGE elválasztáshoz sávonként hozzávetőlegesen 10-50 µg fehérjét vittünk fel a gélekre. Az SDS-PAGE elválasztást 10-18% gradiens géleken végeztük (Laemmli 1970). A futtatás után a géleket 50% metanolt, 7% ecetsavat és 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250-t tartalmazó oldatban festettük, majd a háttér elszíntelenítésére 30%-os metanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatot használtunk. Festés után a géleket deionizált vízben tároltuk. A proteintartalom, valamint a sávok proteintartalmának elemzése Phoretix 4.01 szoftverrel (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK) történt. A proteintartalom méréseket Sárvári Éva és mtsai. (publikálatlan) módszere alapján, a sávok ismert mennyiségű standardhez mért denzitometráásával végeztük.

Fehérjeblottoláshoz a burkolómembrán-fehérjét SDS-PAGE segítségével választottuk el (ld. feljebb. A futtató puffer 25 mM Trisz, pH 8,3, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol és 0,01% (m/v) SDS volt. A blottolt, mosott membránokat 3% (m/v) zselatint tartalmazó TBS pufferben (20 mM Trisz-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl) blokkoltuk. Antitestkezelésként a membránokat 1% (m/v) zselatint tartalmazó TBS pufferben 1:2000 arányban hígított ellenanyagokkal reagáltattuk overnight időtartamra. Az ellenanyagok: mitokondriális alternatív oxidáz (AOX), kloroplasztisz külső burkolómembrán protein-transzlokon komplex 75 kDa fehérje (TOC75) és LHC-fehérjével keresztreakáló, spenót kloroplasztisz belső burkolómembrán trióz-P-transzlokátor (cTPT) poliklonális nyúl antitestek (Agrisera, Sweden) voltak. A nem kötődött antitesteket 0,005% (m/v) Tween-20 tartalmú, majd a nélküli TBS pufferrel lemostuk. A második antitestkezelésként a membránokat 1:3000 arányban TTB pufferben oldott HRP-konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (BioRad, Inc.) reagáltattuk. A membránokat lemostuk, majd előhívó oldattal (0,06% (m/v), -20°C metanolban feloldott HRP Colour Development Reagent™ (BioRad, Inc.), 0,015% (v/v) H₂O₂, TBS pufferben) előhívtuk. A kész membránokat szárítottuk és mielőbb digitalizáltuk. A western blotnál, ahhoz hogy lássuk a sávokat egyelőre megfestett molsúly-standardet használtunk (fermentas).

Kloroplasztisz burkolómembrán vezikulumok Fe^(III)-kelát-reduktáz aktivitásának mérése

Izolált kloroplasztisz burkolómembrán vezikulumok vasredukciós kapacitását vizsgáltuk a reakcióban keletkező Fe²⁺ spektrofotometriás mérésével. A burkolómembrán-vezikulumokba -20 °C fagyasztás/0 °C felolvasztással zártunk be NADPH-t vagy NADH-t. A reakcióelegy (1 mL) összetétele 50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM MgCl₂, 100 µM FAD, 100 µM NAD(P)H és 300 µM BPDS, illetve 50 µg proteintartalommal ekvivalens mennyiségű burkolómembrán-vezikulum volt. A szobahőmérsékletre melegített mintákban a reakciót Fe^(III)-EDTA hozzáadásával indítottuk. Bár a növényi sejt citoplazmájában a vas legnagyobb valószínűséggel vas-citrát komplex formájában van jelen, ennek ellenére a kísérletben Fe^(III)-EDTA-t alkalmaztunk, amely a **8. ábrán** is jól látható módon jobban körülzárja a vasat, mintegy megvédi attól, hogy a NADH molekulák hozzáférjenek, ellentétben a vas-citráttal, amely a NADPH számára sokkal nagyobb hozzáférési felszínt biztosít (**2. ábra**).



8. ábra: Az enzimaktivitás méréshez alkalmazott $Fe^{(III)}$ -EDTA. Az enzimreakció során redukált vas Fe^{2+} és EDTA keletkezett a vas-kelát reduktáz enzim hatására. Az ábrán a molekulát alkotó atomokat különböző színnel jelöltük (narancssárga: vas, kék: nitrogén, szürke: szén, piros: oxigén, fehér: hidrogén).

A minták abszorbancia-emelkedését spektrofotometriásan mértük 535 nm-en, 30 min időtartamon keresztül UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Japan), a spontán abiotikus NAD(P)H- $Fe^{(III)}$ -kelát reakció miatt burkolómembrán-vezikulákat nem tartalmazó vak mintával szemben. A reakció sebességét az abszorbancia-emelkedés lineáris szakaszán határoztuk meg.

Enzimkinetika számítása

A vas-kelát reduktáz reakció enzimkinetikai analízisét Origin v. 6.1052 programmal végeztük el, a telítési kinetika számításához szigmoidális görbét illesztettünk a mérési adatsorra, a számított K_m értékeket a program által megadott szórásokkal tüntetjük fel.

Iontartalom vizsgálatok

Iontartalom méréshez kloroplasztiszokat a burkolómembrán-izoláláshoz használt módszerrel preparáltunk, a mosott kloroplasztiszokat deionizált vízben szuszpendáltuk, majd az izolált intakt plasztisz-mintákat beszárítottuk. A minták előkészítése savas feltárással történt. A mintákhoz 10 ml cc. HNO_3 -at adtunk, majd egy éjszakán át állni hagytunk. Az előroncsolás (30 min, $60^\circ C$) után 3 ml H_2O_2 (30% m/m) adtunk hozzá és tovább roncsoltuk (90 min,

120°C). Roncsolás után deionizált vízzel az 50 ml-re kiegészített mintákat MN 640W jelű szűrőpapíron szűrtük. A minták méréséhez ICP-MS-t (Induktív Csatlósú Plazma Tömegspektrométer, Perkin-Elmer, USA) használtunk.

A minták feltárását Tóth Brigitta és Dr. Lévai László (Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Növénytudományi Intézet, Növényteni és Növényélettani Csoport), az ICP méréseket pedig a Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum, Élelmiszertudományi Minőségbiztosító és Mikrobiológiai Intézet elemáanalitikai laborjának munkatársai végezték.

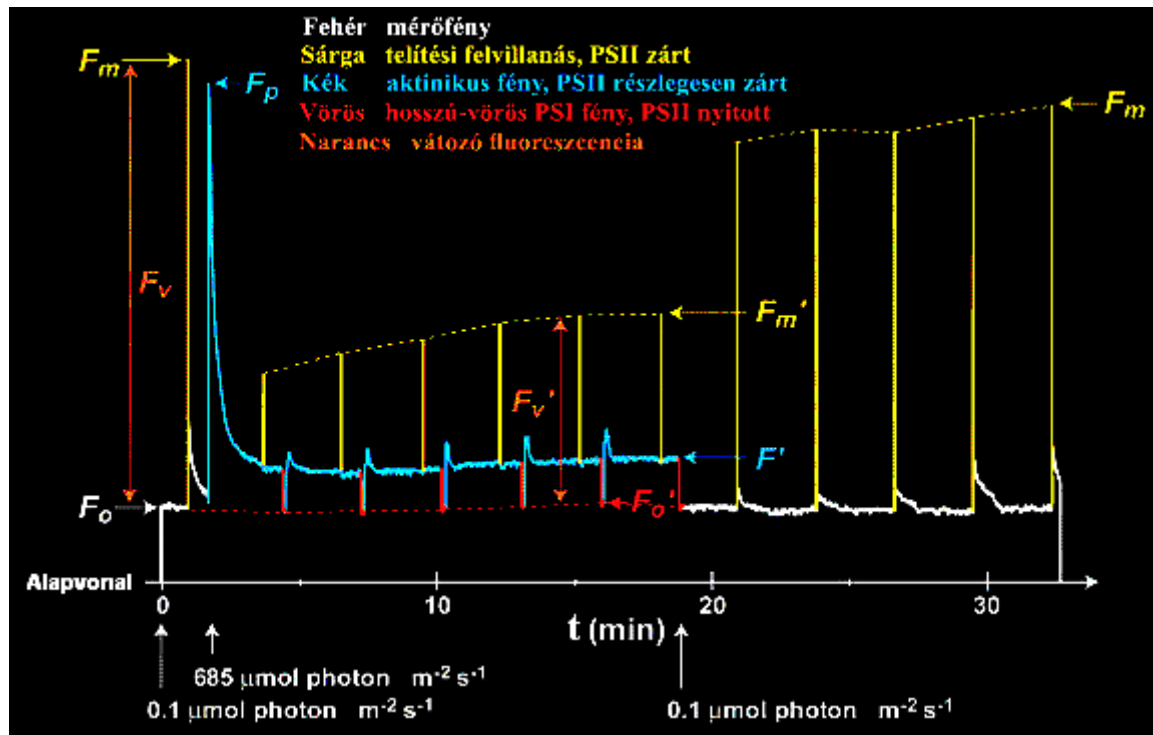
Fluoreszcencia indukció mérés

A klorofill *a* fluoreszcencia indukciós méréseket impulzus amplitúdó moduláció elvén működő PAM 100 fluoriméterrel (Heinz Walz GmbH, Germany) végeztük. Az intakt növények leveleit a levélkamrában 30 percig sötétben adaptáltuk. Az F_0 -szintet a szaggatott mérőfény (intenzitás $<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, modulációs frekvencia 1,6 kHz) bekapcsolása után határoztuk meg (8. ábra). A készülék a fluoreszcens jelet szaggatottan, a mérőfényvel szinkronban szelektíven erősíti (amplitúdó moduláció). A maximális fluoreszcencia intenzitást sötét- (F_m), illetve fényadaptált (F_m') állapotban 0,7 s-os, a PSII elektrontranszportot telítő fehér fényfelvillanást ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fényforrás: KL 1500 electronic, Schott, Germany) követően mértük. A kioltási vizsgálatokhoz aktinikus vörös fényt ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 100 kHz) használtunk. Az alap fluoreszcencia értékét fényadaptált állapotban (F_0') az aktinikus vörös fény kikapcsolása után kis intenzitású ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), hosszú hullámhosszú (720-730 nm) távoli vörös fénnel történő, 3 s-os megvilágítás után mértük, amikor az összes PSII centrum nyitott állapotban volt. A paramétereket a következő egyenletek alapján számoltuk (Baker és Rosenqvist 2004):

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t)/F_m';$$

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m;$$

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$



9. ábra: a fluoreszcencia indukciós és kioltási mérések protokollja. A mérés menetét és a paraméterek jelentését ld. a szövegben (Baker és Rosenquist, 2004).

Eredmények

Iontartalom mérés

A kísérletben plasztisz belső burkolómembránt kontroll és vashiányos körülmények között nevelt cukorrépa levelekből izoláltunk, de az enzimaktivitás mérést megelőzően a fiziológiás állapot felmérése céljából ICP-MS módszerrel vizsgáltuk a különböző feltételek esetén kialakult iontartalmat is a kloroplasztiszokban.

- 1. táblázat: Kontroll és -Fe cukorrépa levelek iontartalma, különös tekintettel a vas ionokra.
(Pirossal kiemelttem azokat az ionokat, amelyeknél vashiány esetén jelentős növekedés figyelhető meg a levelekben a kontroll növényhez képest.)*

Elemek	Ko mmol dm ⁻³	-Fe mmol dm ⁻³
Al	3,1	58,6
B	1,8	3,5
Ba	3,0	2,4
Ca	817,8	1312,3
Cd	0,01	0,02
Cr	0,0	0,1
Cu	0,4	0,2
Fe	6,4	2,3
K	65,3	74,5
Li	0,1	0,2
Mg	211,2	194,9
Mn	0,7	0,6
Mo	0,4	0,5
Na	31,1	43,6
P	24,6	21,8
S	261,1	263,7
Sr	0,5	0,8
Zn	2,8	3,3

Az **1. táblázat** alapján elmondhatjuk, hogy a vashiányos környezetben nevelt növények levelei ténylegesen - háromszor kevesebb- vasat tartalmaztak, mint a kontroll növények, amelyek elegendő vasat vehettek fel. Emellett érdekességgént szeretném megemlíteni, hogy vas hiányában egyes ionok mennyisége a levelekben jelentősen megnő, pl. az alumínium

esetében drasztikus felhalmozás figyelhető meg, de a legtöbb vizsgált ion esetén elmondható, hogy a vashiányos növény nagyobb mennyiségben tartalmazta.

Fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése

A burkolómembrán izoláláshoz nevelt növények levelein fluoreszcencia indukciós méréseket is végeztünk a növények fiziológiás állapotának felméréséhez.

2. táblázat: kontroll és vashiányos növények levelein mért fluoreszcencia indukció. $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ képletekkel számoltunk, ahol F_v : változó fluoreszcencia, F_m : maximális fluoreszcencia sötétadaptált növény esetén, F_m' : maximális fluoreszcencia fényadaptált növény esetén.

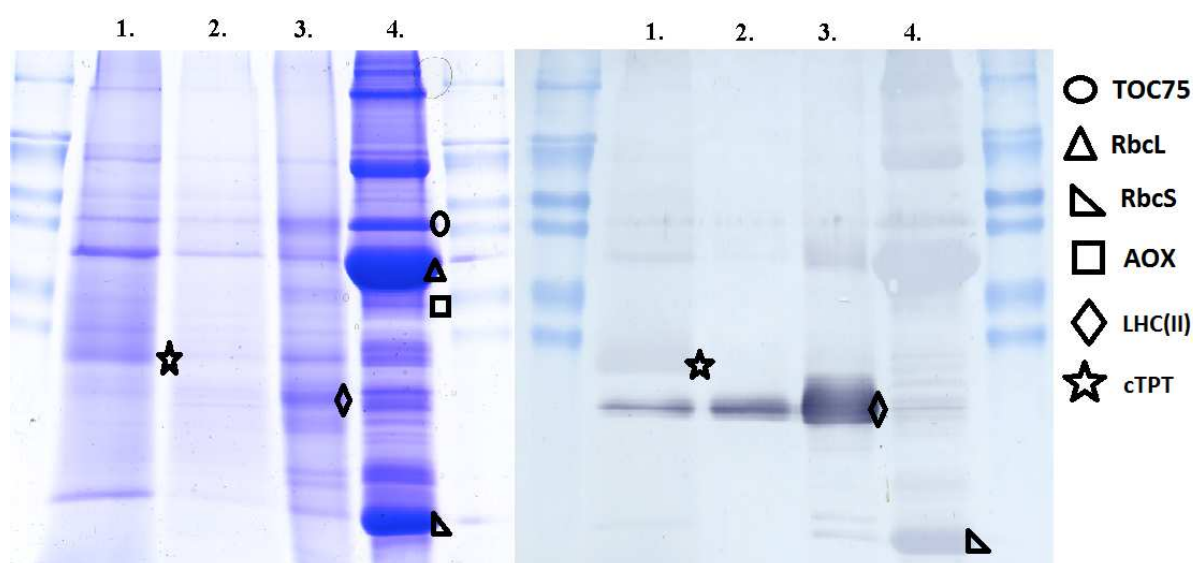
	F_v/F_m	$\Delta F/F_m'$	NPQ
Ko	0,75 ±0,01	0,70±0,01	0,05±0,00
-Fe	0,68±0,04	0,61±0,041	0,08±0,01

Az F_v/F_m érték a PSII maximális kvantum hatékonysága sötétadaptált növényekben, a $\Delta F/F_m'$ érték a PSII effektív hatásfoka, fényadaptált növényre vonatkozóan. Az NPQ (gerjesztési energia hőként való kibocsátása) értéke a nem fotokémiai kioltás mértékét mutatja meg. A vashiányos növények F_v/F_m értéke alacsonyabb, mint a kontroll növényeké, a $\Delta F/F_m'$ értékben szintén hasonló különbség figyelhető meg, az NPQ értéke vas hiánya esetén nagyobb.

A kísérletekben felhasznált membránok tisztasága

Az izolált kloroplasztisz belső burkolómembrán vezikuláink tisztaságát belső burkolómembrán, és egyéb organelláris membránok markerfehérjéire végzett Western blottal

vizsgáltuk (9. ábra). A levél homogenátum (plastisz kiülepítés utáni) felülúszóban TOC75 (kloroplasztisz külső burkolómembrán protein-transzlokon komplex 75 kDa fehérje), a Rubisco és a AOX (mitokondriális alternatív oxidáz) sávját tudtuk kimutani. A külső burkolómembrán mintában is jól látszanak ezek a sávok, míg a tilakoid minta az LHCII-re vastag sávot adott, a külső burkolómembrán pedig csak a cTPT-re (kloroplasztisz belső burkolómembrán trióz-P-transzlokátor) adott egyértelmű sávot.



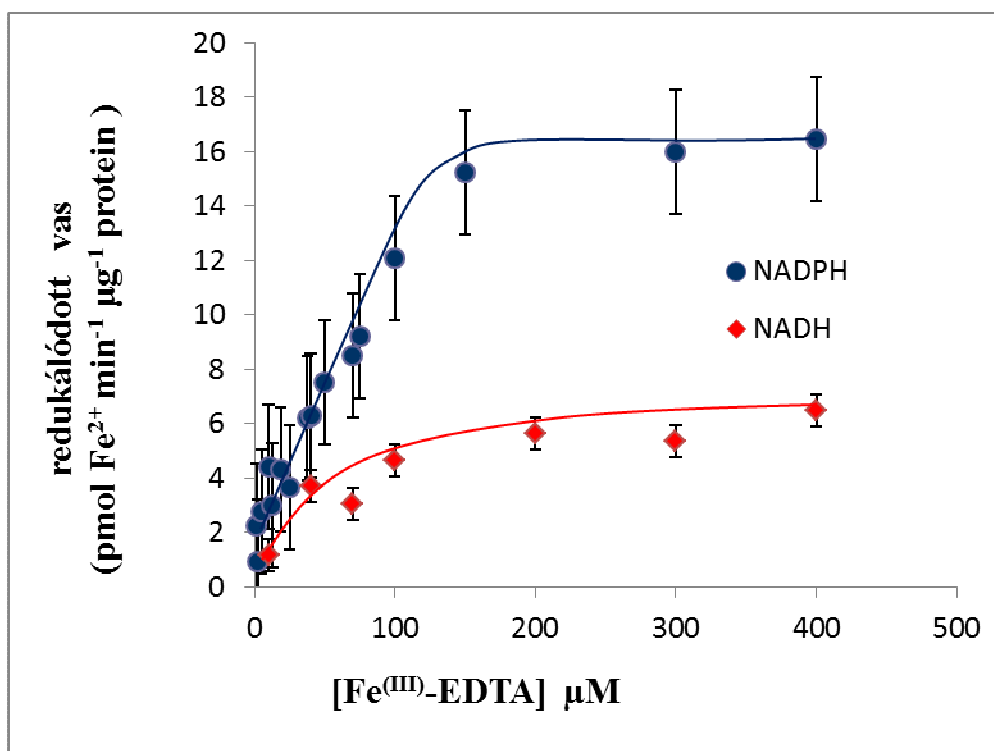
9. ábra: A membránok tisztaságának ellenőrzéséhez használt SDS-Page és Western blot. Az egyes minták tartalma: a legfelső oszlopok mindig a mólsúly standard-et tartalmazzák, 1. belső burkolómembrán izolátum, 2. külső burkolómembrán frakció, a 3. tilakoid frakció, 4. levél homogenátum 20 000 g felülúszó. Az ábrán a jelölések a számunkra fontos sávokra vonatkoznak. Móltömegek: RbcL (Rubisco nagy alegység): 55 kDa, RbcS (Rubisco kis alegység): 13 kDa, AOX: 36 kDa, TOC75: 75 kDa, cTPT: 31 kDa, LHC: 29 kDa.

Vas-kelát redukció mérések

A kloroplasztisz belső burkolómembránok vas-kelát reduktáz aktivitását NADPH, illetve NADH koenzim jelenlétében mértük. Vizsgáltuk emellett a vashiányos növényekből izolált belső burkolómembrán vezikulák vas-kelát-reduktáz aktivitását is. Mérési eredményeink alapján az enzimkinetika telítési görbét mutat kontroll növények esetén NADPH-val és NADH-val is, vashiányos minták esetén azonban egy kétlépcsős telítési görbét kaptunk. Kontroll növényekből izolált membránok esetén kb. 150-200 μM közötti $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA

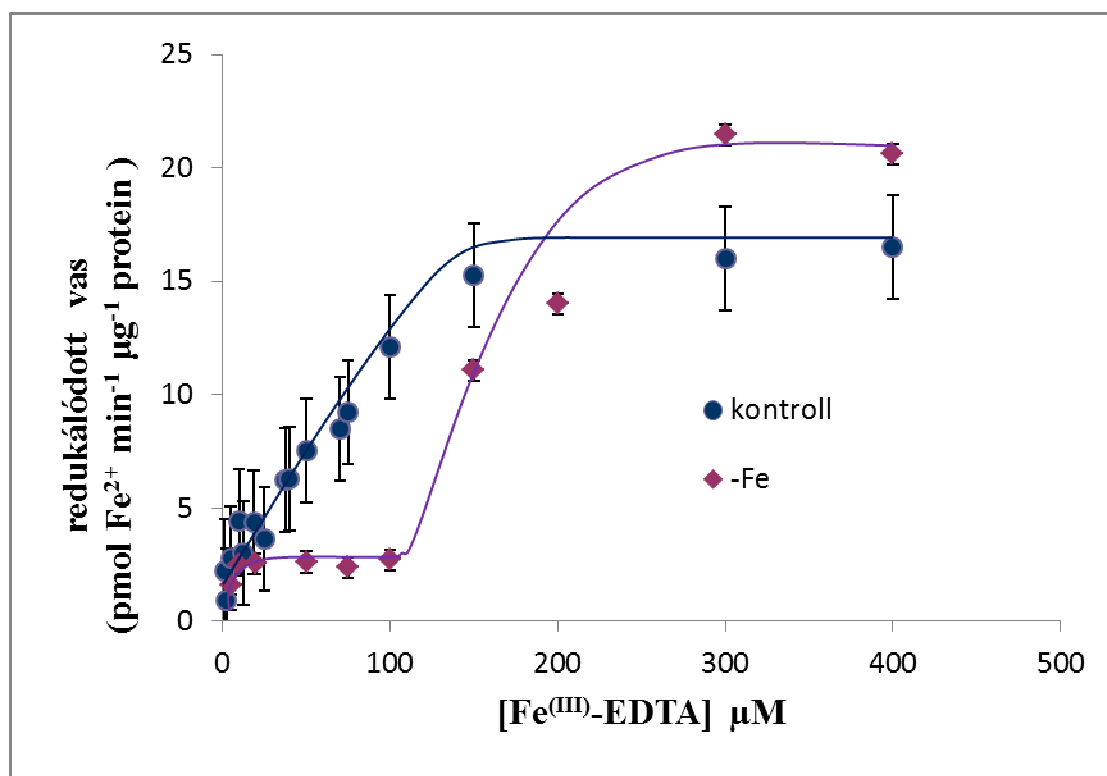
koncentrációnál van a telítési pont, vashiányos növény esetén sokkal hamarabb telítésbe megy a reakció (kb. 50 μM $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA-nál), majd a kontroll növényekre jellemző koncentrációnál újra telítésbe megy.

Az enzimreakciót NADPH-val és NADH-val is mértük és azt tapasztaltuk, hogy NADH esetén az enzimműködés sokkal kevésbé hatékony, mint NADPH-val (**10. ábra**). Ezt a K_m értékek is mutatják, NADPH-val az enzimre jellemző K_m érték $56,44 \pm 0,56 \mu\text{M}$ $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA (a telítési reakciósebesség $16,4 \pm 0,42 \text{ pmol Fe } \mu\text{g protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$), NADH-val a K_m érték ennek kb. másfélszerese, $72,23 \pm 0,36 \mu\text{M}$ $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA (a telítési reakciósebesség $5,51 \pm 0,21 \text{ pmol Fe } \mu\text{g protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$), vagyis sokkal nagyobb szubsztrát koncentráció szükséges ahhoz, hogy az enzim elérje a maximális reakciósebességet, mint NADPH esetén. Kontroll minták esetén a NADPH-val és NADH-val mért eredményeket egy diagramon ábrázolva (**10. ábra**) jól látszik, hogy a telítés hasonló szubsztrátkoncentráció mellett jelentkezik, de szignifikáns különbség van az enzimműködés hatékonyságát illetően.



10. ábra: Enzimreakció (a redukálódott vas mennyisége növekvő szubsztrátkoncentráció függvényében) kontroll membránok esetén NADPH-val és NADH-val.

A vas-kelát-reduktáz reakció sebességét NADPH koenzim jelenlétében vizsgáltuk vashiányos növényekből izolált membránok segítségével is (**11. ábra**). Vashiányos növények esetén az enzimre kis K_m érték jellemző (szignifikáns különbség van a vashiányos és kontroll között), vagyis az enzim már kis szubsztrát koncentrációnál eléri maximális katalitikus hatását, $K_{m1}=2,07\pm1,52 \mu\text{M Fe}^{(\text{III})}\text{-EDTA}$ (a telítési reakciósebesség $v_1=2,59\pm 0,04 \text{ pmol Fe } \mu\text{g protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$), majd magasabb szubsztrát koncentrációk felé haladva újra emelkedni kezd a reakciósebesség, és a kontroll növényeknél megfigyelhető, újabb telítési görbét ad ($K_{m2}=153,07\pm3,31 \text{ pmol Fe } \mu\text{g protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$; a telítési reakciósebesség: $v_2=21,85\pm 3,94 \text{ pmol Fe } \mu\text{g protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$). A méréseket a kontroll vezikulákon kapott eredményekkel összehasonlítva (**11. ábra**) jelentősen eltérő enzimműködést tapasztaltunk, ugyanis vashiányos esetén kis szubsztrátkoncentrációknál az enzimműködés jóval hatékonyabb, kisebb K_m koncentrációt mutat, és alacsonyabb szubsztrátkoncentrációnál telítésbe megy, mint amit kontroll növényenél mértünk, de bizonyos szubsztrátkoncentráció felett a kontroll növényekhez hasonló telítési görbét kaptunk



11. ábra: NADPH jelenlétében végzett enzimreakció (a redukálódott vas mennyisége növekvő szubsztrátkoncentráció függvényében) kontroll és vashiányos növényekből izolált membránok esetén.

Diszkusszió

A vas a növények számára esszenciális tápelem, mely a hajtásban legnagyobb mennyiségben a kloroplasztiszokba épül be. A kloroplasztiszok vasfelvételi folyamata így különös jelentőséggel bír a növények transzportfolyamataiban. Ennek ellenére a kloroplasztiszok vasfelvételének sok mozzanata nem tisztázott még (Duy *et al.*, 2011). Vizsgálatainkban a vasfelvétel folyamatában esszenciálisnak tekintett (Jeong *et al.*, 2008) plasztisz vas-kelát-oxidoreduktáz enzim lokalizációját és működési paramétereit vizsgáltuk.

Vizsgálatainkhoz cukorrépa növényeket használtunk. A cukorrépa sok tekintetben ideális modellnövénynek tekinthető: vízkultúrában, tehát szabályozott tápanyagellátás mellett, klímakamrában nevelhető, a vasfelvétel folyamata és a vashiány tünetei jól ismertek rajta (Larbi *et al.*, 2001), valamint ismert az izolált kloroplasztiszainak vasfelvétele *in vitro* rendszerben (Solti *et al.*, 2012).

A vashiány tüneteinek jellemzésére vizsgáltuk a fotoszintetikus apparátus működésére jellemző fiziológiai paramétereket. A fluoreszcencia indukciós mérések alátámasztják, hogy vas hiányában a klorofill szintézis gátlódik, és a fotoszintézis hatékonysága csökken. A csökkent Fv/Fm, valamint a működő fotoszintetikus elektrontranszportláncot jellemző $\Delta F/F_m'$ paraméter szintén alacsony értéke utal arra, hogy a vashiány nem csak a II. fotoszisztéma (PS), de a sok Fe-S kofaktort kötő, így jelentős vastartalommal rendelkező PSI működését is jelentősen rontotta. A gyengébb fotokémiai kioltás mellett jelentősen erősödött a gerjesztési energia nem-fotokémiai kioltásának mértéke is. A cukorrépa növények vashiányra adott válaszai így megegyeztek a korábban Belkhodja *et al.* (1998), Morales *et al.* (1998) és Abadia *et al.* (1999) által mért eredményekkel.

Ezek mellett több olyan tanulmány is született, amelyek a fotoszintetikus apparátus megváltozását vizsgálják vashiányos környezetben (Moseley *et al.*, 2002, Neumann *et al.*, 2005). A cukorrépa tilakoid fehérjéi jelentős változásokat mutattak vashiány hatására: az elektronszállító komplexek relatív mérete csökkent (Andaluz *et al.*, 2006). Mivel a *fro7* mutáns növények fotoszintetikus elektrontranszportja kevésbé hatékony és kloroplasztiszaik jelentősen kevesebb vasat tartalmaznak – ami egy fontos kofaktor a fotoszintetikus komplexekben –, ezért Jeong *et al.* (2008) azt feltételezték, hogy a *fro7* növényekben a fotoszintetikus apparátus felépítése megváltozott. A *fro7* és a vad típusú növények fotoszintetikus komplexeiben jelentős különbség tapasztalható, de érdekes módon a *fro7* mutáció hatására azok a fotoszintetikus komplexek változtak meg, amelyek hem-kofaktorokat

kötöttek: így a hem nélküli PSI nem változott meg jelentősen a FRO7 hiányában. Részben ez is alátámasztja, hogy vashiány hatására a vas beépülésének elsődleges célpontjai nem a hem-, hanem a Fe-S kofaktorok.

A kontroll és vashiányos körülmények között nevelt cukorrépa növények leveleiből izolált kloroplasztiszokon elvégzett iontartalom vizsgálatok alapján szintén következtetéseket vonhatunk le a vashiány okozta tüneteket illetően. A vashiányos növényekből izolált plasztiszok harmadannyi vasat tartalmaztak, mint a kontroll levelek plasztiszai, tehát a fiziológiai működés szintjén tapasztalt zavarok kiváltó oka a kloroplasztiszok vas-akkumulációjának elmaradása volt. Emellett a vas felvételének hiánya a legtöbb vizsgált ionból fokozottabb felvételt indukált, az alumínium esetében a legszembetűnőbb ez a különbség. A fémionok felvétele jól dokumentáltan kompetícióban áll egymással a gyökér elemfelvétele és a fém-transzlokáció szintjén (Solti *et al.*, 2011), így feltételezéseink szerint hasonló kényszerek, illetve ion-helyettesítések állhatnak a megemelkedett fémfelvétel hátterében, esetünkben is.

Korábbi eredmények alapján ismert, hogy a növények vasfelvételében fontos szerepet játszanak a vas-kelát-reduktázok (Jeong *et al.*, 2008). A kloroplasztisz vasfelvételéért nagymértékben felelős FRO7 jelenlétét már bizonyították, többek között Jeong *et al.* (2008) által végzett mérések alapján rendelkezésünkre állnak adatok a kloroplasztisz vas-kelát-reduktáz aktivitásról, amelyhez 2 hetes vad típusú, *fro7* és 35S::FRO7 csíranövényből izoláltak plasztiszokat. A *fro7* növényekből izolált plasztiszok 75%-os vas-kelát-reduktáz aktivitás csökkenést mutattak a vad típusúhoz képest és a 35 S::FRO7 növényekből izolált plasztiszok aktivitása visszaállt a vad típus plasztiszainak szintjére. Ez egyértelmű bizonyítéka annak, hogy vas-kelát reduktáz aktivitás jelen van a plasztiszokban és ezért a FRO7 felelős. Emellett azt is sikerült kimutatniuk, hogy a mutáns kloroplasztiszok kevesebb vasat tartalmaztak a vad típusúaknál, ami azt sugallja, hogy a redukciós stratégiának szerepe van a vasfelvételben. Bughio *et al.* (1997) árpa kloroplasztiszokon végeztek kísérletet, melynek során $\text{Fe}^{(II)}$ -kelátorok hozzáadásával a vasfelvétel gátlódott, ez bizonyítja a Fe^{3+} redukcióját a vas influx során a kloroplasztiszban. Ugyanakkor az enzim működéséről, lokalizációjáról még nem állnak rendelkezésünkre korábbi adatok (Jeong és Conolly, 2009).

Az enzimaktivitás mérését megelőzően vizsgáltuk az izolált mintáink tisztaságát, mellyel az enzimaktivitás adott membránfrakcióhoz kötöttségét kívántuk bizonyítani. Western blot módszerrel ellenőriztük, hogy a mintánk (belső burkolómembrán frakció) mennyire

szennyezett külső burkoló- és tilakoidmembránokkal. A TOC75 sávja gyakorlatilag nem jelenik meg a belső burkolómembrán izolátumban, vagyis a külső burkolómembrán jelenléte elhanyagolható, viszont a cTPT sávja markánsan láthatóvá válik, vagyis a mintánkban főleg a belső burkolómembrán fehérjéi vannak jelen. Az Agrisera AG-től beszerzett ellenanyag (valószínűleg immunizálási szennyezés következményeként) LHC-fehérjékkel is mutat reakciót, melyet kihasználtunk a tisztaság ellenőrzésének vizsgálatakor: a tilakoidok esetén erős LHC-festődés jelent meg, ellenben a megtisztított, belső burkolómembrán mintánk nem tartalmazott LHC-fehérjéket. A tilakoid szennyezés így egyértelműen kizárható. A mitokondriális alternatív oxidáz sávja csak a levél homogenátum felülúszójában adott jelet vagyis mitokondriális eredetű membrántörmelékek/fehérjék sem befolyásolták a méréseinket, nem voltak jelen a mintánkban. Vizsgálatainkat tehát nagy tisztaságú kloroplasztisz belső burkolómembrán vezikulákon végeztük, amelyből az következik, hogy a vizsgált enzim, mint ahogyan azt Duy *et al.*, (2011) és Solti *et al.*, (2012) prediktálta, a kloroplasztiszok belső burkolómembránjában helyezkedik el *in vivo*.

Az enzimaktivitás méréshez $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA kelátot használtunk, melynek módszertani oka van, ugyanis a vas-citrát *in vivo* NADPH-val azonnal reakcióba lép és rövid időn belül elredukálódik a reakcióelegyhez hozzáadott vas teljes mennyisége, ezáltal az enzimműködés vizsgálatát lehetetlenné teszi. A NADPH nagyrészt a burkolómembrán vezikulumok belsejébe zártan található, de elkerülhetetlen, hogy a reakcióelegyben ne maradjon kis mennyiségben NADPH (NADH), amely már elegendő ahhoz, hogy a Fe^{3+} ionok elredukálódjanak, ezért alkalmaztunk az enzimaktivitás méréshez $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA-t.

Mérési adataink alapján a vas-kelát-reduktáz enzim kontroll növényekből izolált membránok esetén NADPH-val nagyobb hatékonysággal képes redukálni a szubsztrátot, mint NADH-val, tehát *in vivo* valószínűleg a NADPH a reakcióban részt vevő koenzim. Ez azért is valószínű, mert a NADPH aránya jelentősen magasabb a kloroplasztisz sztrómában a NADH-hoz képest (Harvey és Brown, 1969), ellenben a citoplazmában a NADPH/NADH arány fordított. A kloroplasztiszban lévő magasabb NADPH tartalom azzal is magyarázható, hogy az itt lezajló fotoszintézis fényreakciójában az elektronok a ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktáz (FNR) közvetítésével végső soron NADP⁺-re kerülnek. A keletkezett NADPH részt vehet a kloroplasztisz vasszorbálási folyamatában is. Ennek alapján feltételezhető, hogy közvetlen kapcsolat van a kloroplasztisz vasszorbálása és a fotoszintézis fényreakciójának között, vagyis a vasszorbálás fényfüggő/fotoszintézis függő folyamat (Solti *et al.*, 2012). Ezt alátámasztja az is, hogy a folyamat sötétben illetve DCMU (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea, fotoszintetikus

elektrontranszportlánc gátlószere) jelenlétével gátolható (Bughio *et al.*, 1997). Tehát a kloroplasztiszok vas-kelát-reduktáza valószínűleg a fotoszintézis fényszakaszában keletkező NADPH-t használja. Mindezeket összevetve vizsgálati eredményeinkkel, valamint Jeong *et al.*, (2008) és Solti *et al.*, (2012) méréseivel, arra következtethetünk, hogy az enzim a belső burkolómembránban helyezkedik el, NADPH-kötőhelye a membrán sztróma felőli oldalán található, és a redukció a kloroplasztisz két burkolómembránja közötti térben mehet végbe *in vivo*. Bár a FRO7 egy oxidoreduktáz enzim, tehát akár fordítva is végbemehetne a folyamat, de az eredmények azt bizonyítják, hogy NADPH és FADH₂ jelenlétében a kelált Fe³⁺ redukálódik, lehetőséget teremtve a szabaddá váló Fe²⁺ felvételére.

A kontroll és vashiányos növényekből izolált belső burkolómembrán vezikulák között az enzimműködés szintén szignifikáns különbséget mutat. Vashiány esetén az enzimaktivitás kettős szaturációs görbét mutatott. Alacsony vas-koncentrációk hozzáadása esetén egy hirtelen emelkedés figyelhető meg és gyorsan telítésbe megy, majd az enzimaktivitás újra emelkedik és magasabb vaskoncentrációknál újabb telítési görbét kapunk. Ilyen kétkomponensű rendszereket már megfigyeltek más ionok, pl. K⁺ felvétel esetén is (Schroeder *et al.*, 1987, Schroeder *et al.*, 1994)

A vashiány hatására megjelent alacsony K_m-mel jellemezhető szaturáció az enzimnek a szubsztráthoz, vagyis a Fe-keláthoz való megnövekedett affinitását jelzi. A kontroll és a vashiányos plasztiszokban mért különbség az enzimműködésben így valószínűleg azzal magyarázható, hogy vashiány hatására maga az enzim változik meg, esetleg izoformaváltást indukál a vashiány. Több ismert genomú zárvatermő növény prediktált proteinjeit összevetve (ARAMEMNON adatbázis, frissítve: 2012. 03. 28) a hajtásban több FRO is expresszálódik, melyek közül csak az *Arabidopsis thaliana* ortológjainak lokalizációjáról vannak információink. Nem elképzelhetetlen tehát, hogy a vashiányos cukorrépa kloroplasztisz belső burkolómembrán vas-kelát-reduktáz aktivitásában tapasztalt jelenségért egy új izoforma megjelenése a felelős. A plasztiszok ezzel alkalmazkodnak a vashiányos állapothoz, és így hatékonyabban tudnak vasat redukálni és felvenni. Mind tartósan vashiányos növényekben, mind hosszú távú nehézfémstressz által indukált vashiány hatására megfigyelhető a kloroplasztisz-vastartalom emelkedése változatlan levél-vastartalom mellett (Solti, 2012 PhD). Mikami *et al.* (2011) vashiány hatására az intakt árpa kloroplasztiszokon is emelkedő vas-kelát-reduktáz aktivitást mértek, mely szintén megerősíti a vashiány aktiváló, affinitást növelő hatását. Az izolált IE vezikulák vas-kelát reduktáz aktivitásában egy második telítés is jelentkezett, mely jellegében megegyezett/nagy hasonlóságot mutatott a kontroll levelekből izolált minták vas-kelát reduktáz aktivitásával. Vashiány hatására tehát egy olyan

kétkomponensű rendszer alakult ki, amelyből a kis affinitású tag valószínűleg megegyezik a kontroll vas-kelát reduktázával, azonban ezzel párhuzamosan egy nagy affinitású rendszer is megjelenik a membránban.

Összegzés

Az eredmények tükrében megállapítottuk, hogy a kloroplasztiszok vasfelvételében kulcsfontosságú szerepet játszik egy vas-kelát-reduktáz enzim, amely a kloroplasztisz belső burkolómembránjában lokalizálódik és a $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -komplexek/kelátok redukciójában vesz részt. Az enzim elfogad mesterséges ferri-kelátot ($\text{Fe}^{(\text{III})}$ -EDTA) is, amely lehetővé teszi az aktivitásának a mérését. Megállapítottuk, hogy az enzim működéséhez egyértelműen a NADPH, mint redukáló-kapacitás valuta jelenlétét preferálja. Hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a vashiányos környezet, illetve a megfelelő minőségű koenzim jelenléte. A vasfelvétel mechanizmusa szorosan kapcsolódik a fotoszintézis fényszakaszához. Egyrészt nagymértékben befolyásolja a fotoszintetikus produktivitást a megfelelő mennyiségű vas felvétele és beépülése a pigmentszintézishez szükséges enzimekbe, másrészt pedig a fényszakaszban képződő NADPH meghatározza a vasfelvétel hatékonyságát, azáltal, hogy koenzimként szolgál a vas-kelát-reduktázok számára.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Szigeti Zoltán tanszékvezetőnek, hogy lehetőséget biztosított dolgozatom az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén való elkészítéséhez.

Köszönöm témavezetőmnek, Solti Ádámnak folyamatos segítségét a munkám során, segítőkészségét, dolgozatom alapos és kritikus átnézését és hasznos tanácsait. Valamint köszönet másik témavezetőmnek Dr. Fodor Ferencnek, amiért folyamatosan nyomon követte és észrevételeivel hozzájárult a dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm Dr. Lévai Lászlónak (DE Mezőgazdasági Növényteni és Növényélettani Tanszék) az iontartalom-vizsgálatokat és a fluoreszcencia indukció méréseket Solti Áadámnak.

Köszönöm Ostorics Zsuzsa segítségét a módszertan elsajátításában, valamint technikai segítségét a labormunkák elvégzéséhez.

A kutatásokat az ERA Chemistry – OTKA NN-84307 számú pályázata támogatta.

Irodalomjegyzék

- Abadía J, Morales F, Abadía A (1999): Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves, *Plant and 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 Phys. Biochem.* 49: 471-482.
- 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.
- Balk J, Lobréaux S (2005): Biogenesis of iron–sulfur proteins in plants, *Trends Plant Sci.* 10: 324-331.
- 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, *Plant and Soil* 56: 265-276,
- Briat J-F, Curie C, Gaymard F (2007): Iron utilization and metabolism in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 276–282.
- Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F (2010a): Ferritins and iron storage in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1800: 806–814.
- Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F (2010b): New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants, *Ann. Bot.* 105: 811-822.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa NK, Mori S (1997): Characteristics of light-regulated iron transport system in barley chloroplasts, *Soil Sci Plant Nutr.* 43:959–963.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimuri E, Nishizawa N-K, Mori S (1997): Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 38: 101-105.

- Cheng L, Wang F, Shou H, Huang F, Zheng L, He F, Li J, Zhao F-J, Ueno D, Ma JF, Wu P (2007): Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice, *Plant Physiol.* 145: 1647–1657
- Conte S, Lloyd A (2010): The MAR1 transporter is an opportunistic entry point for antibiotics, *Plant Signal. Behav.* 5: 49-52.
- Conte S, Stevenson D, Furner I, Lloyd A (2009): Multiple antibiotic resistance in Arabidopsis is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein, *Plant Physiol.* 151: 559-573.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Jean ML, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009): Metal movement within the plant: contribution of nictotianamine and yellow stripe 1-like transporters, *Ann. Bot.* 103: 1–11
- Dell’Orto M, Santi S, De Nisi P, Cesco S, Varanini Z, Zocchi G, Pinton R (2000): Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity, *J. Exp. Bot.* 51: 695-701.
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE (2007): The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation, *Plant Physiol.* 144: 197–205
- Duy D, Stübe R, Wanner G, Philippar K (2011): The Chloroplast Permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron, *Plant Physiol.* 155(4): 1709–1722.
- Guerinot ML (2000): The ZIP family of metal transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 190–198
- Harvey MJ, Brown AP (1969): Nicotinamide cofactors of intact chloroplasts isolated on a sucrose density gradient, *Biochim. Biophys. Acta* 172: 116-125.
- Haydon MJ, Cobbett CS (2007): Transporters of ligands for essential metal ions in plants, *New Phytol.* 17: 499–506
- Heazlewood, JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004): Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights

- signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins, *Plant Cell* 16: 241–256
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2006): Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} , *Plant J.* 45: 335–346
- Jeong J, Guerinot ML (2009): Homing in on iron homeostasis in plants, *Trends in Plant Science* 14: 280-285.
- Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML (2008): Chloroplast $\text{Fe}^{(\text{III})}$ chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions, *PNAS* 105: 10619–10624.
- Jeong J, Connolly EL (2009): Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases, *Plant Science* 176: 709-714.
- Kato H, Hagino N, Grossman AR, Ogawa T (2001): Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol.* 183: 2779–2784.
- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML (2006): Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1, *Science* 314: 1295-1298.
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygo H, Thomine S (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron, *EMBO J.* 24: 4041-4051.
- Larbi A, Morales F, López-Millán AF, Gogorcena Y, Abadía A, Moog PR, Abadía J (2001): Technical advance: reduction of $\text{Fe}(\text{III})$ -chelates by mesophyll leafdisks of sugar beet. Multi-component origin and effects of Fe-deficiency, *Plant and Cell Physiology* 42: 94-105

- McMaster J, Oganessian VS (2010): Magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the structures of the metal sites in metalloproteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20: 615–622.
- Morales F, Abadía A and Abadía J (1998): Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves, *Austral. J. Plant Physiol.* 25: 403 - 412
- Moreau S, Day DA, Puppo A (1998): Ferrous iron is transported across the peribacteroid membrane of soybean nodules, *Planta* 207: 83-87.
- Morrissey J, Guerinot ML (2009): Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome, *Chem. Rev.* 109: 4553–4567.
- Moseley JL, Allinge T, Herzog S, Hoerth P, Wehinger E, Merchant S, Hippler M (2002) Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus, *EMBO J* 21:6709–6720.
- Mukherjee, I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006): Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper, *Planta* 223: 1178–1190
- Naumann B, Stauber EJ, Busch A, Sommer F, Hippler M (2005): N-terminal processing of Lhca3 Is a key step in remodeling of the photosystem I-light-harvesting complex under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 280:20431–20441.
- Nikolić M, Römhelt V (2007): The dynamics of iron in the leaf apoplast, *Biomed. Life Sci.* 5: 353-371
- Olsen RA, Clark RB, Bennett JH (1981): The enhancement of soil fertility by plant roots, *Am. Scient.* 69: 378–384.
- Rellán-Álvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodríguez-Castrillón J Á, García-Alonso J I, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2009): Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport, *Plant Cell Physiol.* 51: 92-102

- Robinson NJ, Proctor CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999): A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils, *Nature* 397: 694–697.
- Römheld V (1987): Different strategies for iron acquisition in higher plants, *Plant Physiol.* 70: 231–234
- Römheld V, Marschner H (1986): Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses, *Plant Physiol.* 80: 175-180.
- Santi S, Cesco S, Varanini Z, Pinton R (2005): Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants, *Plant Physiol. Biochem.* 43: 287-292.
- Santi S, Schmidt W (2008): Laser microdissection-assisted analysis of the functional fate of iron deficiency-induced root hairs in cucumber, *J. Exp. Bot.* 59: 697-704.
- Santi S, Schmidt W (2009): Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots, *New Phytol.* 183: 1072-1084.
- Sattelmacher B (2001): The apoplast and its significance for plant mineral nutrition, *New Phytol.* 149: 167–192
- Schaaf G, Schikora A, Häberle J, Vert G, Ludewig U, Briat JF, Curie C, von Wirén N (2005): A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis, *Plant Cell Physiol.* 46: 762-774.
- Schagerlöff U, Wilson G, Herbert H, Al-Karadaghi S, Hagerhall C (2006): Transmembrane topology of FRO2, a ferric chelate reductase from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* 62: 215–221.
- Schmidt W (2003): Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants, *Plant Sci.* 8: 188–193
- Schroeder JI, Raschke K, Neher E (1987) : Voltage dependence of K⁺ channels in guard-cell protoplasts, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4108-4112
- Schroeder JI, Ward JM, Gassmann W (1994): Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 441-471

- Shingles R, North M, McCarty RE (2002): Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes, *Plant Physiol.* 128:1022–1030
- Solti Á (2012): Cd-Fe interferencia a vasháztartásban és a fotoszintézisben, PhD értekezés, ELTE TTK Doktori Iskola.
- Solti Á, Kovács K, Basa B, Vértes A, Sárvári É, Fodor F (2012): Uptake and incorporation of iron in sugar beet chloroplasts, *Plant Phys.* 52: 91-97
- Solti Á, Sárvári É, Tóth B, Basa B, Lévai L, Fodor F (2011): Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar, *Plant Phys.* 49: 494-498
- Tanaka R, Tanaka A (2007): Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:321–346.
- Terry N, Abadia J (1986): Function of iron in chloroplasts, *J. Plant Nutr.* 9: 609-646
- Timperio AM, D’Amici GM, Barta C, Loret F, Zolla L (2007): Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves, *J. Exp. Bot.* 58: 3695–3710
- Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds, *Plant Physiol.* 141: 1446–1458
- Winterbourn CC (1995): Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction, *Toxicol. Lett.* 82/83: 969-974.
- Wu F, Yang W, Zhang J, Zhou L (2010): Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil, *J. Hazard. Mat.* 177: 268–273.
- Wu H, Lihua L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ (2005): Molecular and biochemical characterization of the Fe(III)-chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 46: 1505-1514.