

A protoklorofillid szerepe a fejes káposzta belső leveleiben lejátszódó fotooxidációs folyamatokban

Társszerzők:

**Smírová Lilla, II. éves Biológus MSc-s és Erdei Anna Laura, III. éves Biológus
BSc-s hallgató**

Témavezető: Dr. Böddi Béla, egyetemi tanár

ELTE TTK, Biológiai Intézet, Növény szervezettani Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

Összefoglalás	3
Bevezetés	3
Anyag és módszerek	13
Növényi anyag	13
Spektrofluorometria	13
Akcióspektrum mérése	13
Oxigén elvonás	16
Hőmérsékletfüggés	16
A bleaching időlefutása és a bleaching utáni regeneráció	17
Eredmények és megvitatásuk	17
Az alapjelenség magyarázata	18
Hatásspektrum	24
Oxigénelvonás	27
A hűtés hatása	28
Következtetések	30
Irodalomjegyzék	31

Összefoglalás

A fejes káposzta (*Brassica oleracea* cv. *capitata*) belső leveleiben található protoklorofillid növényélettani szerepét vizsgáltuk. Korábbi munkákban kimutatták, hogy ezekben a levelekben a protoklorofillidnek a monomer, nem közvetlenül fotoaktív formája nagy mennyiségben van jelen. Felvetődik a kérdés, hogy ez a forma más növényekben leírtakhoz hasonlóan itt is kifakulást indít-e el. A kifakulás hatásspektrumát mértük meg a 600-660 nm-es spektrum tartományban 160 minta, szobahőmérsékleten mért emissziós spektrumának számítógépes feldolgozásával. A Gauss komponensek integrál arányainak a változása bizonyította, hogy a 632.5 nm-es protoklorofillid forma váltja ki leghatékonyabban a kifakulást. A folyamat kinetikáját He-Ne lézer (632.8 nm-es) fényével történt megvilágítással is nyomunköveltük. A kiváltott fotooxidációs folyamatok körülményeit (oxidációs intermedierek keletkezése, hőmérsékletfüggés, oxigéntartalom csökkentése) vizsgáltuk. A kifakított mintákban megvizsgáltuk a protoklorofillid formák regenerációját. Eredményeink azt mutatják, hogy a protoklorofillid nemcsak a klorofill bioszintézis intermediere, hanem a fotooxidációs folyamatok szenzibilizátora is, így élettani szempontból káros lebomlási folyamatokat is kiválthat. Ezekre a jelenségekre a hétköznapi gyakorlatban is figyelmet kell fordítani.

Bevezetés

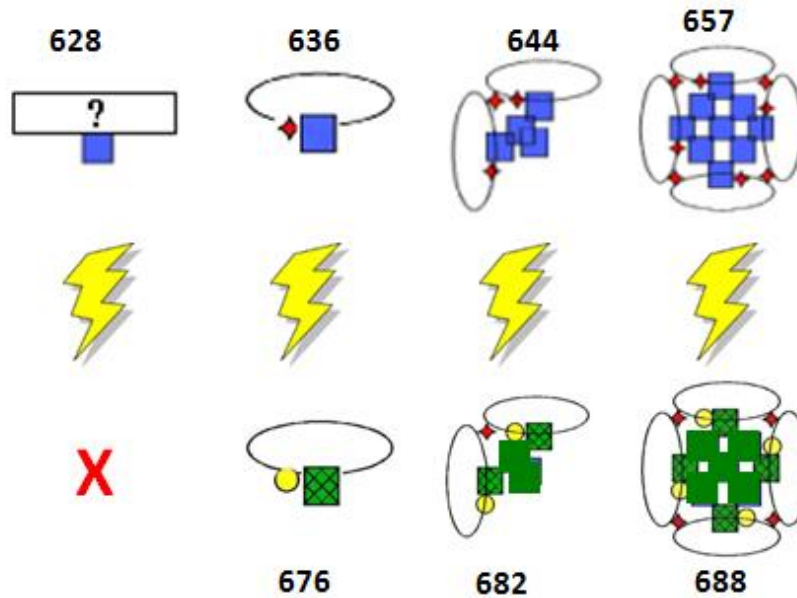
A fotoszintézis során a növények fényenergiát hasznosítanak szerves anyagok bioszintézisére, ebben a folyamatban a klorofilok központi jelentőségűek. A klorofill-bioszintézis többlépcsős, zárva-termőkben fényindukált folyamat, melynek során kialakul a makroaromás szerkezetű fitol-oldalláncot tartalmazó klorofill-a és klorofill-b. A klorofill-bioszintézis fényindukált részlépését tanulmányoztuk, melyben a 2-vinil-protoklorofillid NADPH jelenlétében, a hetedik és nyolcadik C-atom közötti kettős kötés telítésével klorofilliddé alakul. A folyamatot a protoklorofillid-NADPH-oxidoreduktáz enzim (POR enzim) katalizálja (*Griffiths 1978, Beale, 1999*).

Az L-POR (light dependent=fényérzékeny) enzim a rövidláncú alkohol-dehidrogenázok családjába tartozik, amely enzimek általában dimer, vagy tetramer formában aktívak (*Yang és Cheng 2004*).

A fényérzékeny POR enzim három független szabályozású izoformája ismert; a POR-A, POR-B és POR-C. *Arabidopsis thaliana* fényben nevelt *porB* és *porC* hiánymutáns csíranövényeket tanulmányozva kiderült, hogy ezek funkcionálisan helyettesíthetők a POR-A izoformával, a hiánymutáns csíranövények fejlődése nem szenvedett zavart. Az etiolált *porB* hiánymutáns csíranövényekben az enzim a prolamelláris testek kisebbek voltak, ez arra utal, hogy a POR-A forma mellett a POR-B is szerepet játszhat a prolamelláris testek összeszerelődésében. A *porC* hiánymutáns növények zöldülése gátolt volt nagy fényintenzitáson, ez arra utal hogy a POR-C enzim működik ilyen körülmények között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy mindhárom izoforma szerepet eltérő játszhat a zöldülési folyamatban, míg a fényen nevelt növényekben az egyes izoformák azonos szerepet töltenek be. Egyes vizsgálatok szerint a borsóban egyféle L-POR enzim végzi protoklorofillid redukcióját. (Masuda és mtsai, 2003).

A magasabbrendű növények etioplasztiszaiban legnagyobb mennyiségben előforduló enzim az L-POR, amely főként a prolamelláris testek membránjához kötődik. Aktív formában oligomer, katalitikus jellemzőit a borsó enzimje esetében részletesen vizsgálták. Az enzim aktivitásához NADPH és protoklorofillid kapcsolódása szükséges, hatékonyságát növeli, ha az enzim oligomerizálódik. Az enzim rendkívül alacsony hőmérséklet-optimummal rendelkezik, in vitro körülmények között -18 °C-on a legaktívabb (Sironval és Brouers, 1970).

A protoklorofillidnek többféle spektrális formája van; amelyek szerkezetükben és a bioszintézisben betöltött szerepükben is eltérnek. A 629 és 633 nm hullámhosszú fényt emittáló forma nem flash-fotoaktív, és feltételezhetően a protoklorofillid monomer formája található benne, a pigment nem POR enzimhez kötött formájának feleltethető meg, vagy ha a POR enzimhez kötődik a pigment, annak nem az aktív központjában kötött (Böddi és mtsai, 1996, Kahn és mtsai, 1970). A 644 és 655 nm hullámhosszú forma a protoklorofillid flash-fotoaktív dimer és oligomer, azaz a POR hármas alegységei dimérré vagy oligomerré aggregálódnak. Mindkét forma az aktív központban kötött pigmentek mellett tartalék pigmenteket is köt (Böddi és mtsai, 2003). Ez a két utóbbi forma főleg a prolamelláris testek membránjában található.



1.ábra: A NADPH-POR komplexek különböző formái és fluoreszcencia komponenseik hullámhosszmaximuma (Böddi és mtsai, 2012)

Fény hatására a a NADPH-POR-protoklorofillid komplex NADP⁺-klorofillid-POR komplex-szé alakul, a protoklorofillid D-gyűrűben található 17. és 18. számú szénatom közötti kettős kötés telítésével, a folyamathoz szükséges két elektront és két hidrogén iont a NADPH, és az enzim aktív központjában a pigmentet kötő tirozin biztosítja (a tirozin a közegből felvett protonnal azonnal vissza is redukálódik) (Griffiths, 1978). (Az enzim NADPH- és protoklorofillid kötött harmadlagos formája aktív, a NADPH kötésért a lánc 225. számú tirozin és 279. számú lizin oldallánca felelős, a protoklorofillid megkötésében erősen konzervált cisztein oldalláncok játsszák a legfontosabb szerepet (Reinbothe és mtsai, 1996). A kialakuló klorofillid-POR komplex egyes eredmények szerint már instabil, proteázoknak nem ellenálló (Reinbothe és mtsai, 1995).

Más adatok viszont azt bizonyítják, hogy a POR nagyon stabil, a benne kötött összes pigment kifakítása után is megőrzi natív szerkezetét (Szenzenstein és mtsai, 2010).

A kiszabaduló klorofillid helyére új protoklorofillid molekulák kapcsolódnak, így regenerálódni tudnak a fotoaktív formák. A fototranszformációs folyamatot elsősorban etiolált leveleken tanulmányozták, a folyamatban főleg az oligomer forma vesz részt, a 629 és 633 nm

hullámhosszú monomer formák csak közvetetten, mintegy pigment-raktárként kapcsolódnak. A fototranszformáció előtti és megvilágítás utáni spektrum jellegzetes eltérést mutat: a 655 nm-es forma mennyisége lecsökken, és 692-696 nm-nél új, klorofillid komplexnek megfelelő sáv jelenik meg. Ezt követően a mintát sötétben vagy fényen tartva a 692-696 nm-es maximum kék felé tolódik el (Shibata shift): megjelenik egy új csúcs 680 nm-nél, amely a klorofillid-a vagy a klorofill-a monomerjére jellemző (Böddi és mtsai, 2003).

A protoklorofillid fény által gerjeszthető makroaromás elektronrendszerrel rendelkezik és a megfelelő energiájú fénnel megvilágítva alapállapotból gerjesztett állapotba kerül.

Gerjesztési energiájától többféleképpen megszabadulhat:

- (1) Az energia távozhat kisugárzott hő, illetve fény formájában.
- (2) Az energiatranszfer során a gerjesztési energia más molekuláknak adódik át, melynek feltétele, hogy a molekulák közel legyenek egymáshoz, illetve az akceptor molekula azonos vagy alacsonyabb energiával gerjeszthető legyen, mint a donor molekula. Amennyiben kémiaiilag azonos molekulákról van szó, ezt a jelenséget energiamigrációnak nevezzük. Ha kémiaiilag eltérő molekula az energia akceptor, energia transzferről beszélünk. Energia-akceptor lehet a molekuláris oxigén is, ebben az esetben szingulet, gerjesztett oxigén keletkezik, ami fotooxidációs reakciósorozatot indít el.
- (3) A gerjesztett állapotú molekula elektron/proton donor hiányában oxidálódhat, azaz elektront adhat le.

Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok szerint a protoklorofillid formák aránya eltér az egyes növényi szövetekben, ami meghatározza, hogy fény hatására fototranszformációs vagy fotodestrukciós folyamatok játszódnak le nagyobb mértékben.—Az előbb ismertetett eredményeket etiolált levelek vizsgálatával kapták. Kiderült viszont, hogy a nem levél eredetű szövetekben gyakran a monomer állapotú protoklorofillid (vagy protoklorofill) mennyisége dominál, így például az etiolált borsó epikotiljában a bleachingben szerepet játszó formák aránya a fototranszformálható formákéhoz viszonyítva nagyon magas (Böddi és mtsai, 1994).

Az epikotilban két, 629 és 636 nm-nél emittáló, monomer állapotú protoklorofillidet tartalmazó formát azonosítottak ezek közül egyik sem volt rövid idejű flash megvilágítással jelentős mértékben fototranszformálható (Böddi és mtsai, 1998). Különböző fehérjekárosító kezelések

(például hűtés, melegítés, mikrohullám) bizonyították, hogy a protoklorofillid nagyrészt POR-hoz nem kötött formában van jelen a borsó epikotiljában, az emissziós spektrum ezek hatására nem változott. Búza levelek estében azonban tapasztalható volt a protoklorofillid formák emissziós spektrumának balra tolódását, ami fehérje-pigment oligomer komplexek jelenlétére utalt (*Böddi és mtsai, 1994*).

A spektrum alacsonyabb hullámhosszúságú komponensei: a 629 és 636 nm-es a protoklorofillid monomer formákhoz tartoznak, közöttük energiamigráció nem történt, valószínűleg a két komponens egymástól távol helyezkedik el. A 629 nm-es forma megfelelt a levelekben megismert monomer enzimtől független protoklorofillid-a molekulának, a levelekben nem ismert 636 nm-es forma egy része a POR-A enzim monomerjéhez kötött monomer protoklorofillidnek felelt meg. E formának egy része flash-megvilágítás hatására klorofilliddé alakul (*Kósa és mtsai, 2005*), illetve mesterségesen (glicerines-szaharózos homogenátumban) oligomer, 644 és 655 nm-en emittáló flash-fotoaktív formává alakítható (*Kósa és mtsai, 2006*). A rövidebb hullámhosszúságú formák legnagyobb mennyiségben az epikotil középső régióiban fordultak elő.

A növények zöldülése során fototranszformáció történik, ekkor a fotoaktív protoklorofillid komplexek klorofillid komplexekké alakulnak. A fotoaktív komplexek állandó regenerációja biztosítja a fototranszformáció folyamatosságát.

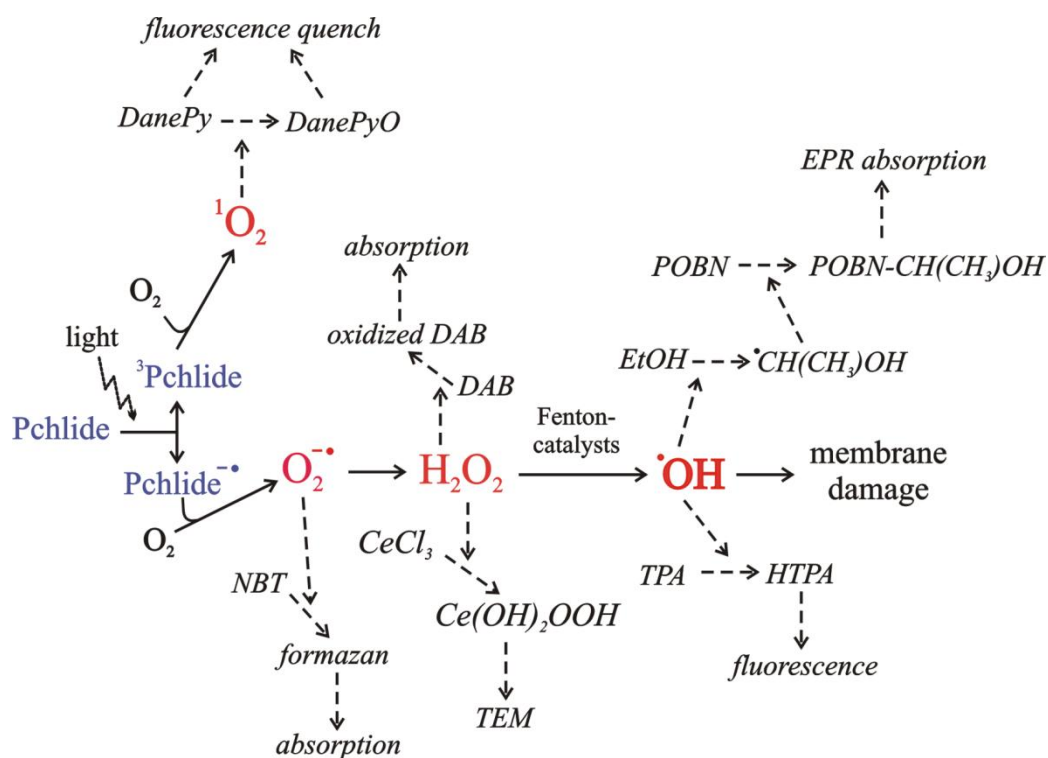
A rövid idejű flash megvilágítás után a fotoaktív protoklorofillid, NADPH és oligomer POR alkotta komplexek átalakulnak klorofillid és NADP⁺ alkotta, 680-678 nm fluoreszcencia maximummal rendelkező komplexekké. Ezután kétféle változás következhet be: egyrészt a klorofillid leválása a komplexről, ami a spektrum alacsonyabb hullámhosszak felé tolódását okozza (670- 675 nm-es fluoreszcencia maximum), másrészt a NADP⁺ helyettesítése NADPH-val, aminek hatására nagyméretű klorofillid tartalmú komplexek keletkeznek 684-695 nm maximummal. Ezek a komplexek a klorofillid leválásával és protoklorofillid kapcsolódásával fotoaktív formává alakulhatnak vissza.

Az előbb ismertetett klorofillid szintézis mellett fény hatására egy másik folyamat is lejátszódhat, amelyet az angol szakirodalomban bleaching-nek, magyarul elfehéredésnek (kifakulásnak) neveznek (*Smeller és mtsai, 2003*), ez a legtöbb sötétben nevelt zárvatermő csíranövényben lejátszódik. Az elfehéredés során a NADP-hez és POR enzimhez nem kötött

protoklorofillid molekulák gerjesztő fény hatására fotooxidációt szenvednek. Ennek a folyamatnak a legfontosabb feltétele, hogy jelen legyenek a monomer POR enzimhez illetve NADPH-hoz nem kötött protoklorofillid illetve klorofillid formák. A folyamat nem jelentős olyan etiolált szövetekben amelyek etioplasztiszi kiterjedt prolamelláris testeket tartalmaznak, mivel ezek membránjában fototranszformálható protoklorofillid-NADPH-POR komplexek találhatók. Egyes etiolált szövetekben megvilágítás hatására a sejtmembránok károsodnak, emiatt a sejtek nagy mennyiségű vizet veszítenek, ami hervadáshoz vezet.

A bleaching során a gerjesztett monomer protoklorofillid, mivel nem kapcsolódik POR enzimhez és NADPH-hoz, nem tud elektron felvenni a C17-C18 közötti kettőskötés telítéséhez, energiáját a sejtben oldott molekuláris oxigénnek adja át, így ROS (Reactive Oxigen Substance) molekulák keletkeznek: szinglett oxigén, szuperoxid gyök, hidroxil gyökök és hidrogén-peroxid jelenik meg (*Erdei és mtsai, 2005*). Ezek reakcióba lépnek a pigmenttel ami fluorescens jellegét elveszítve degradálódik, emellett lipidperoxidációt okoznak, ami membránkárosodáshoz vezet. A fluoreszcencia spektrum jellegzetesen változik: az összintegrál és a kis hullámhosszúságú monomer formák aránya is nagymértékben csökken. A folyamat molekuláris oxigént igényel, mivel ebből keletkeznek a folyamatot generáló reaktív oxigéngyökök (*Hideg és mtsai, 2010*).

A reaktív oxigén gyökök képződésének mechanizmusát borsó epikotil esetében részletesen vizsgálták. Az epikotil középső régiójában volt a legintenzívebb a ROS képződés, ez igazolja a monomer formák szerepét a folyamatban. Fény hatására bekövetkező hervadási reakcióért szintén a ROS termékek felelősek, ez hidrogén-peroxid bevitelével fény nélkül is bekövetkezhet, illetve a fotodestrukción átesett hervadó szövetekben nagy mennyiségű ROS képződést mutatható ki. A vizsgálatok alátámasztották, hogy a molekuláris oxigénből képződő primer termék a szuperoxid gyök, ebből további reakciókban hidrogén-peroxid, majd hidroxil gyök keletkezik.



2. ábra: ROS képződés útjai, és az egyes ROS formák kimutatási lehetőségei (Hideg és mtsai, 2010).

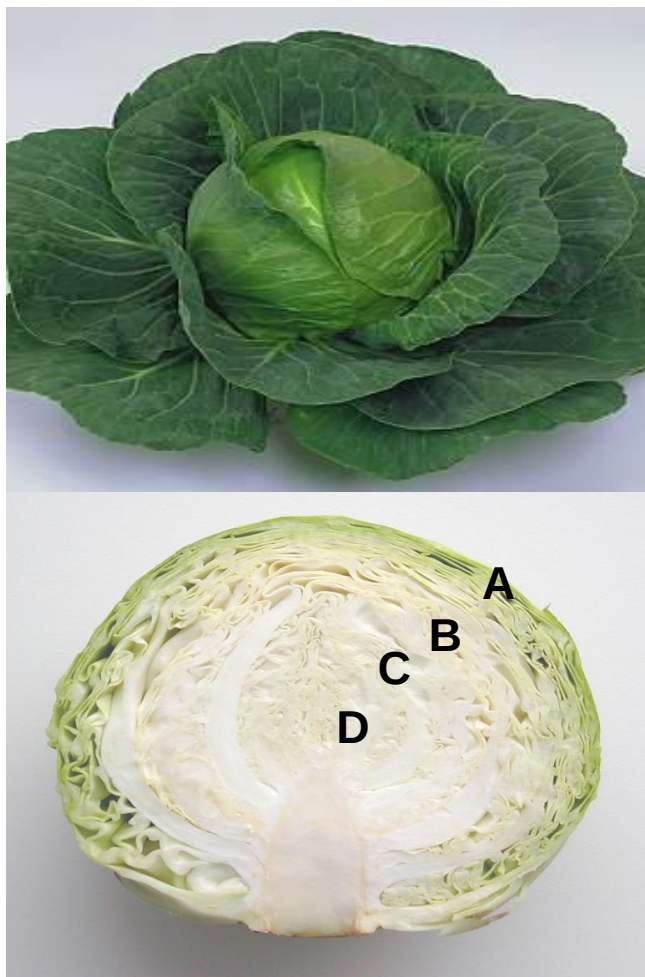
Bleaching után a sötétben tartott növényi szövetekben is megfigyelhető a regeneráció. A borsó epikotil legnagyobb mennyiségben a protoklorofillid monomer nem fotoaktív formáját tartalmazza, itt fény hatására fotodestrukciós folyamatok játszódnak le. A megvilágítás hatására a protoklorofillid pigmentek mennyisége a kiindulási minta mennyiségének 3%-ára csökkent, míg a POR enzim mennyisége pedig a felére. A fotoaktív 655 nm-es forma akkor regenerálódott, ha az a kiindulási méréskor is jelen volt a mintában. Ebből arra következtethetünk, hogy a 655 nm-es formában lévő POR enzim szükséges volt a fotoaktív komplex újraképződéséhez.

A regeneráció alatt a protoklorofillidek *de novo* szintézise történt, a regeneráció után a pigmentek mennyisége megnőtt. A 655 nm-es protoklorofillid formák aránya magasabb volt, mint a kiindulási méréskor. A protoklorofillid először a fotoaktív POR komplexbe épül be, a monomer formák mennyisége akkor nő, ha már nincs jelen szabad POR enzim. (Szenzenstein és mtsai, 2010).

A POR enzim de novo szintézise nem az egyedüli folyamat, amely szerepet játszik bleaching után a fotoaktív formák regenerációjában. Az egyes szövetekben az ismertetett folyamatok egymáshoz viszonyított jelentősége erősen eltérhet.

A bleaching akárcsak a klorofill akkumuláció hőmérsékletfüggő folyamat; alacsonyabb hőmérsékleten nagyobb intenzitással megy végbe. Az alacsony hőmérséklet optimumnak több magyarázata van. Egyrészt a lipidmembrán fluiditása alacsony hőmérsékleten csökken, ami a membránkapcsolt enzimek sérülékenységét, és oxigéngyököknek való kitettségét növeli. Az oxidáció alacsony hőmérsékleten NADPH-t is érinti, ami meggátolja a szobahőmérsékleten bekövetkező regenerációt. A másik magyarázat az, hogy a védő, regeneráló funkciójú enzimek aktivitása alacsony hőmérsékleten lecsökken. Ezekkel ellentétes hatás a hidrogén-peroxid diffúziósebességének csökkenése, ami miatt a ROS hatás kiterjedtsége csökken, ugyanakkor a harmadlagos NADPH-Protoklorofillid-POR oligomer komplexek regenerációja is csökken a klorofillid szintézise után, mivel a monomer protoklorofillid formák diffúziósebessége is kisebb. Az alacsony hőmérséklet hatását tovább erősíti, hogy a keletkező klorofillid molekulák csak lassan képesek a klorofill-szintetáz enzim közelébe diffundálni, ami miatt szintén a fotodestrukció áldozataivá válhatnak.

A bleaching és fototranszformáció eltérő hullámhosszon gerjeszthető protoklorofillid formákból indul ki, amelyek eltérő fluoreszcencia maximumú sávjaik alapján azonosíthatók. Feltételezzük, hogy a fotodestrukciós folyamatok aktivitását a gerjesztő fényintenzitás mellett a hullámhossz is befolyásolja.



A = külső levélréteg

B = középső levélréteg

C = belső levélréteg

D = kísérleteinkben használt legbelső levélréteg

3.ábra: A fejes káposzta levélrétegei (Böddi, 2012)

A fejeskáposzta (*Brassica oleracea* varietas *capitata*) módosult hajtása fontos közéleti cikk. A Brassicaceae családba tartozó zöldségfélék nagy mennyiségben tartalmaznak karotinoidokat C és E-vitaminokat, illetve egyéb antioxidánsokat, melyek védik a sejteket az oxidatív károsodásoktól. A fejeskáposzta hajtásszerkezetére jellemző, hogy levelei szorosan ráfekszenek a torzsának nevezett hajtástengelyre, emiatt a leveleket fejlődésük során eltérő intenzitású fény éri. Ezek a káposztafej belsejében keletkeznek teljes sötétségben, így kifelé haladva nemcsak a levelek fénykitettsége, de fejlődési stádiuma is változik (Solymosi és mtsai, 2004).

A legbelső levelek gyakorlatilag teljes sötétségben fejlődnek, emiatt etiolált levelekhez hasonló pigmentösszetétellel és plasztiszszerkezettel rendelkeznek, ugyanakkor primordiális jellegük miatt el is térnek azoktól. Nem tartalmaznak klorofillt, csak protoklorofillidet, illetve annak

észterezett formáját; protoklorofillt 2:1 arányban. A protoklorofillid eltérő aggregációs stádiumú POR enzimhez kötött formái közül a monomer 632,4 nm-es forma dominál, az oligomer 655 nm-es formából igen kis mennyiség van jelen. A legbelső levelek primordiális stádiumban vannak, gázcserenyílásaik fejletlensége, proplasztiszaik szegényes belső membránrendszere is erre utal (*Solymosi és mtsai, 2004*).

A középső levélrétegekben a 695nm-es fluoreszcencia maximummal rendelkező klorofill és egyes munkák szerint annak még nem észterezett formája, a 680 nm-es klorofillid van jelen emellett a zöld levelekre jellemző klorofill-protein komplexek. A legkülső levelek a kifejlett, zöld levelekre jellemző tulajdonságokkal rendelkeznek. ((*Solymosi és mtsai, 2004*).

A legbelső leveleken az etiolált növényekhez hasonlóan a fototranszformációs és fotodestrukciós folyamatok is jól tanulmányozhatók. A levelekben található protoklorofillid formák közül a 632,4 nm-es forma dominál, ami a fotodestrukciós folyamatokban vehet részt, így ezeken a leveleken nagy intenzitású bleaching váltható ki. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogyan befolyásolja a kifehéredés és a fototranszformáció arányát a megvilágító fény hullámhossza.

Anyag és módszerek

Növényi anyag

A fejes káposzta fehér változatával dolgoztunk (*Brassica oleracea* cv. *capitata*). A káposzta belső leveleit kis intenzitású zöld fényben vágtuk ki. Erről a megvilágításról megelőző kísérletekben kiderült hogy nem vált ki sem fotoredukciót, sem pedig fotooxidációt.

Spektrofluorometria

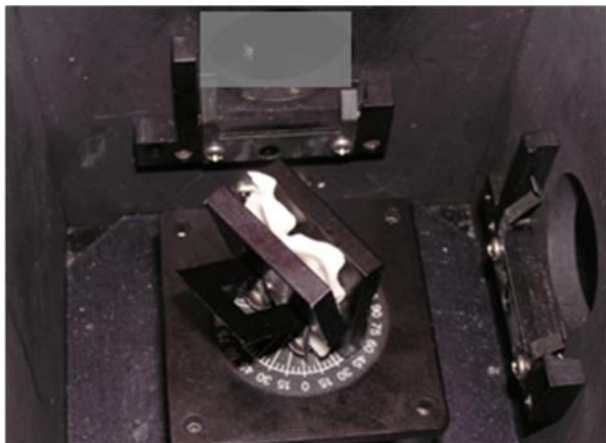
A fluoreszcencia emissziós spektrumokat Fluoromax 3 Jobin Yvon Horiba spektrofluorométerrel mértük. A levéldarabokat a készülék szirárdminta tartójába helyeztük, amit 45 °-os szögbe állítottunk be a gerjesztőfényhez viszonyítva. A gerjesztő fény hullámhossza 440 nm volt, a spektrumokat 580 és 780 nm között regisztráltuk 0.5 nm-es adatgyakorisággal. A gerjesztő rés 2 nm, az emissziós rés 5 nm volt. A megvilágítás előtti és utáni spektrumokat ugyanarról a mérési pontról regisztráltuk.

Akcióspektrum mérése

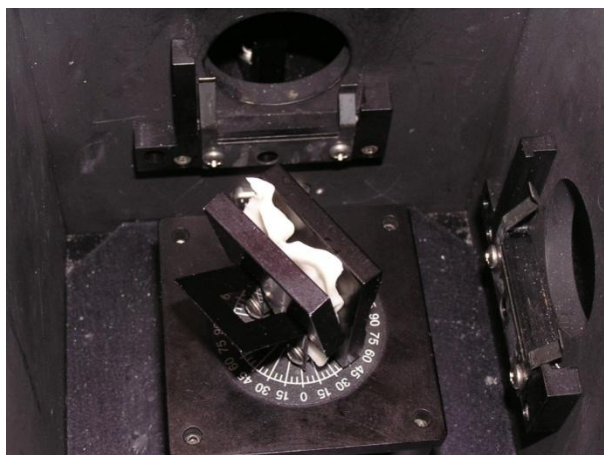
A káposztalevelekről szobahőmérsékleten spektrumot mértünk 440 nm gerjesztési hullámhosszon, 580 és 780 nm fluoreszcencia közötti intervallumon. Ez úgy volt lehetséges, hogy a spektrofluorométer gerjesztőfényét neutrális szűrővel olyan mértékben csökkentettük, hogy csak minimális fototranszformációt váltson ki a spektrum regisztrálása során. Ezután a neutrális szűrő kivételével a fluoriméter gerjesztőfényét adott értékre állítottuk be, és a mintákat 5 percen keresztülvilágítottuk, 600 és 660 nm közötti megközelítőleg monokromatikus fénnel: 2 nm-es résszélességgel. A lámpa foton flux denzitása (PFD) $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ körüli érték volt a xenon lámpa spektrumától függően változó. Az egyes hullámhosszokon kissé eltérő PFD értékeket figyelembe véve utólag korrigáltuk az eredményeket. A megvilágított mintáról a neutrális szűrő visszahelyezése után az előző paraméterekkel (gerjesztés 440 nm-en detektálás 580 és 780 nm között) új spektrumot vettünk fel, így összetartozó sötét- megvilágított spektrum párokat kaptunk. A 600-660nm közötti megvilágítási tartományon 21 hullámhosszártéken vettünk fel spektrumot, minden érték esetén három párhuzamos mérést végeztünk eltérő levéldarabokkal. A mérés összesen 126 spektrumot eredményezett, amelyek páronként összetartoztak. A spektrumokat utólag korrigáltuk, és Gauss komponensekre bontottuk; erre az SPSERV programot (Copyright: Bagyinka Csaba MTA SzBK) használtuk. A

korrekció valamennyi esetben 5 pontos lineáris simítást, alapvonal-korrekciót és a készüléknek a hullámhossztól függő érzékenységeire való korrekciót jelentett. A Gauss komponensekre történő bontást a hullámszám függvényében végeztük, az eredményeket a program visszaszámolta hullámhossz függvényére.

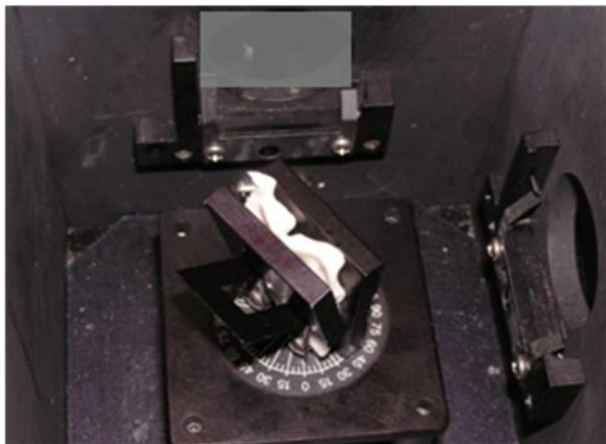
4.ábra: A spektrofluoriméter használata: a minta rögzítése a mintatartóban, a mintatartó behelyezése a fluorométerbe és a neutrális szűrő használata a sötét és a megvilágított spektrum felvételekor



A.: „sötét” minta mérése a neutrális szűrő behelyezésével



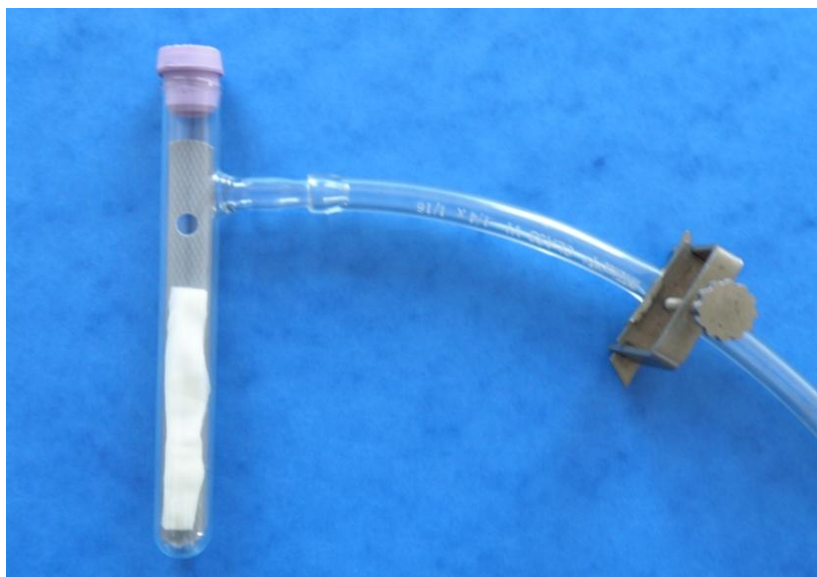
B.: a minta „kifakítása” (bleaching) a neutrális szűrő kivételével



C.: A „kifakított”minta mérése a neutrális szűrő behelyezésével

Oxigén elvonás

A bleaching ROS-függését oxigénelvonásos kísérlettel tanulmányoztuk. A mintát egy speciális mintatartó kémcsőbe helyeztük, amelyet gumidugóval lezártunk és kivezetőcsövére Hoffman szorítót erősítettünk. A kémcsövet alufóliával lefedtük, hogy a mintát ne érje fény. A kivezetőcsövet a vízlégszivattyúra kötöttük és fél órán át szivattyúztuk. A kémcsövet a fluoriméterbe helyeztük és a fentiekben leírt módon spektrumokat regisztráltunk, illetve 632.5 nm-es fénnel részlegesen kifakítottuk a mintákat. A kontroll kísérletben oxigénelvonás nélkül azonos körülmények között megmértük a minta fluoreszcencia spektrumát megvilágítás előtt és után.



5. ábra: Az oxigénelvonásos feltételben használt mintatartó eszköz és a Hoffman szorító

Hőmérsékletfüggés

A káposzta belső leveléről először sötétben spektrumot vettünk fel, amelyből kiderült hogy az adott minta alkalmas-e a kísérletre. Ezután a mintát sötétben 20 percre -4°C -os hűtőszekrénybe helyeztük. A hűtés után megmértük neutrális szűrő mellett a minta megvilágítás előtti fluoreszcencia spektrumát, majd a mintát 632,5 nm hullámhosszúságú fénnel megvilágítottuk neutrális szűrő kivételével 5 percen keresztül. Ezután megmértük a minta megvilágítás utáni spektrumát. A kontroll kísérletben szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektrumot vettünk fel

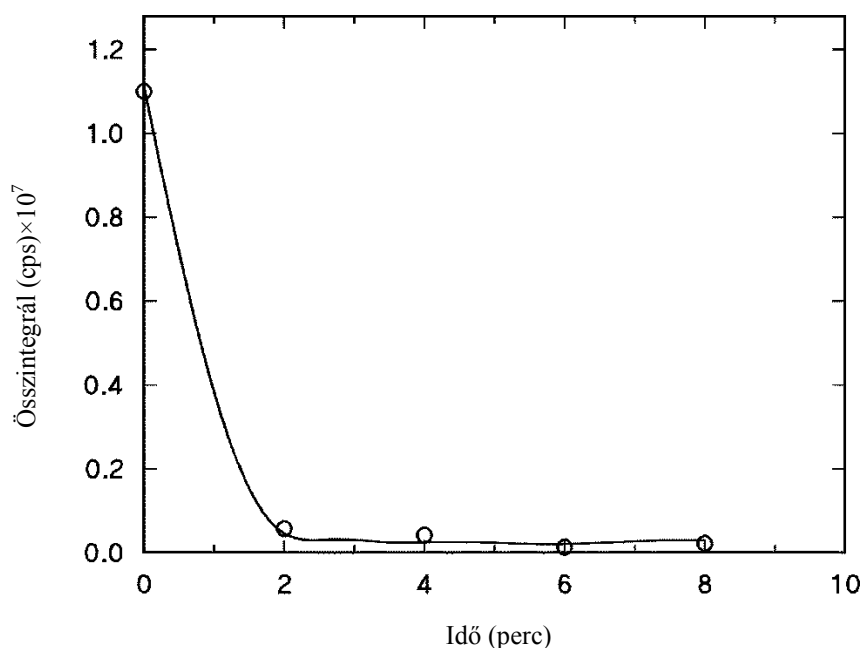
azonos levélrétegből származó mintán majd 5 percig megvilágítottuk, és regisztráltuk a minta megvilágítás utáni spektrumát.

A bleaching időlefutása és a bleaching utáni regeneráció

A fejeskáposzta levéldarabját mintatartóba helyeztük, majd sötétben, szobahőmérsékleten egy kontroll spektrumot mértünk meg. Ezt Melles Griot 25-LHR-151-230 He-Ne lézer 632 nm-es fényével világítottuk meg (melynek intenzitása $600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}^{-1}$) 2 perces időtartamokra, amit 4-szer megismételtünk. Minden 2 perces megvilágítás után spektrumot regisztráltunk. A 4. megvilágítás és spektrum mérés után a mintát sötétben 3 óráig inkubáltuk, és ezután megmértük a fluoreszcencia spektrumát.

Eredmények és megvitatásuk

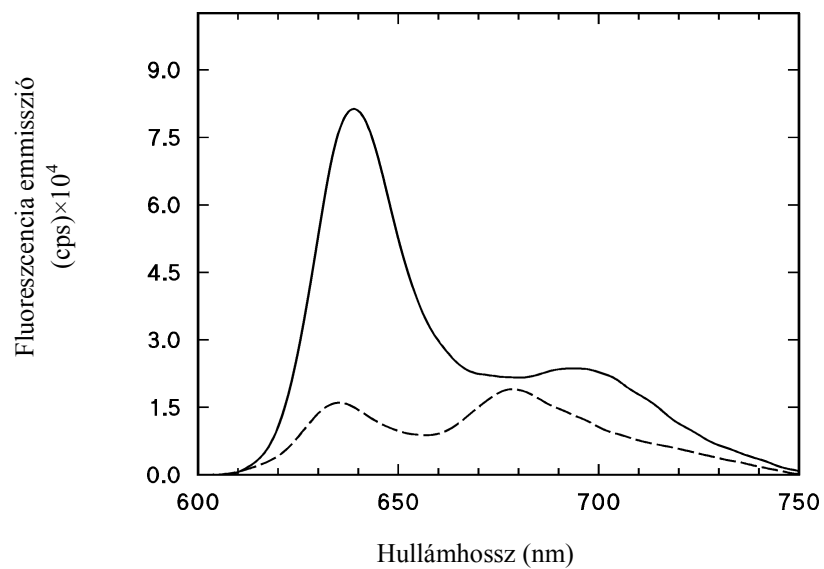
A bleaching időlefutása



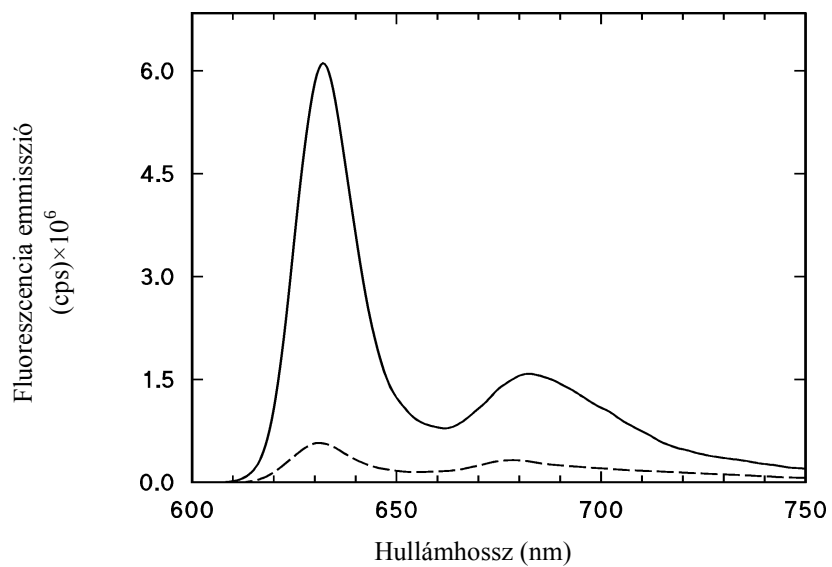
6. ábra: Az összintegrál változása ismételt 2 perces megvilágítások hatására

Már az első 2 perces megvilágítás után kb. 90%-kal csökkent az összintegrál értéke, tehát már ezalatt az idő alatt lezajlott a bleaching, és a további megvilágítás már nem csökkentette jelentősen az összintegrál értéket. A további kísérletek során 5 perces megvilágítást alkalmaztunk, amely a megfigyelni kívánt folyamatok lejátszódásához biztosan elegendő volt

Az alapjelenség magyarázata



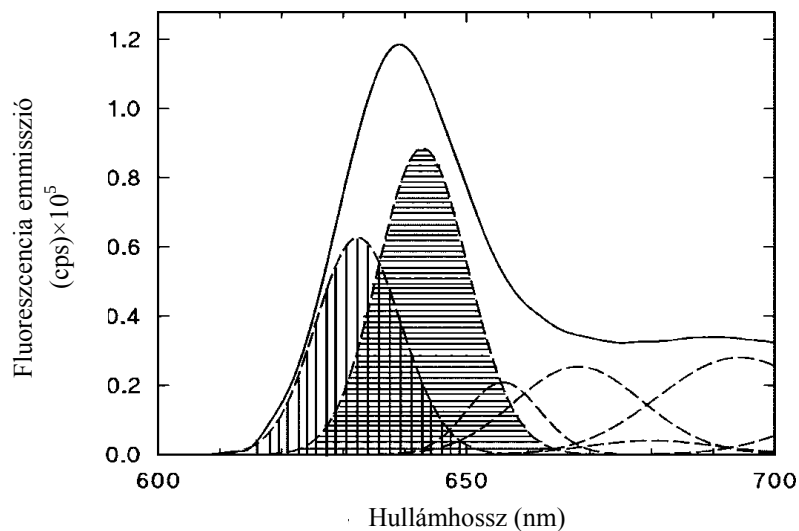
7. ábra: A fejeskaposzta szobahőmérsékleten mért sötét és megvilágított spektruma



8. ábra: A fejeskaposzta folyékony Nitrogénben (77K) mért sötét és megvilágított spektruma

A fluoreszcencia spektrumokat az SPSERV program használatával Gauss-bontással az alábbi táblázatban feltüntetett Gauss-komponensekre bontottuk:

Komponensek maximuma (nm)	Félértékszélesség(nm)
632,4	16,24
642,9	17,21
655,9	14
668,1	24,28
680	25
694,3	31,21
718	30,65



9.ábra: A minta sötét spektrumának Gauss bontása

A 632,4 nm-es komponens a monomertől származó jel, a 642,9 nm-es komponens a dimer, míg a 655,9 nm-es komponens az oligomer formától származik.

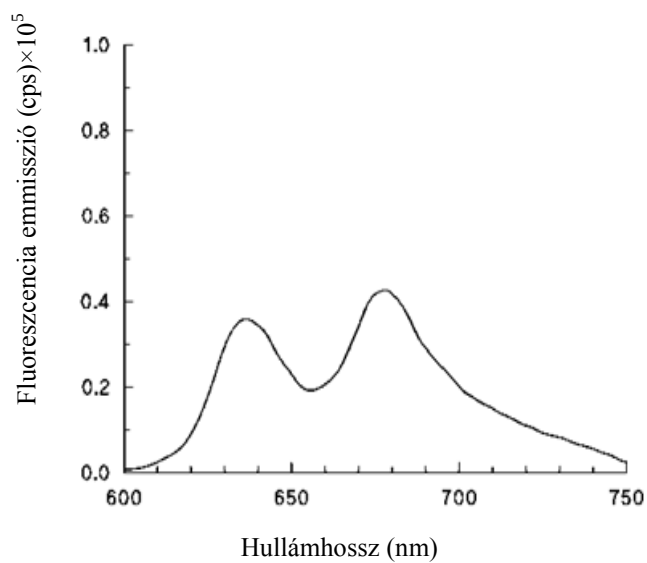
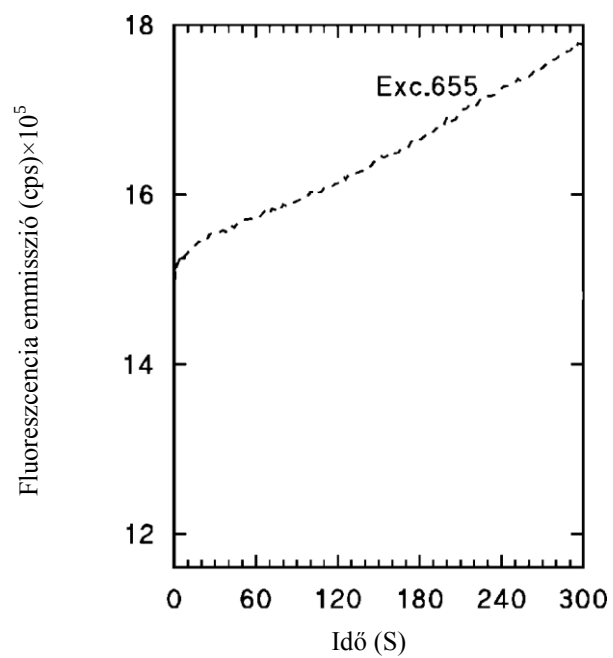
A 668,1 nm hullámhosszúságú jel több komponensből áll, szerkezete kevésbé ismert.

A 680 nm hullámhosszúságú maximummal rendelkező komponens a klorofillid-től származik, a magasabb hullámhosszúságú komponensek pedig vibrációs alsávjai a protoklorofillidformák alacsonyabb hullámhosszúságú fősávjainak.

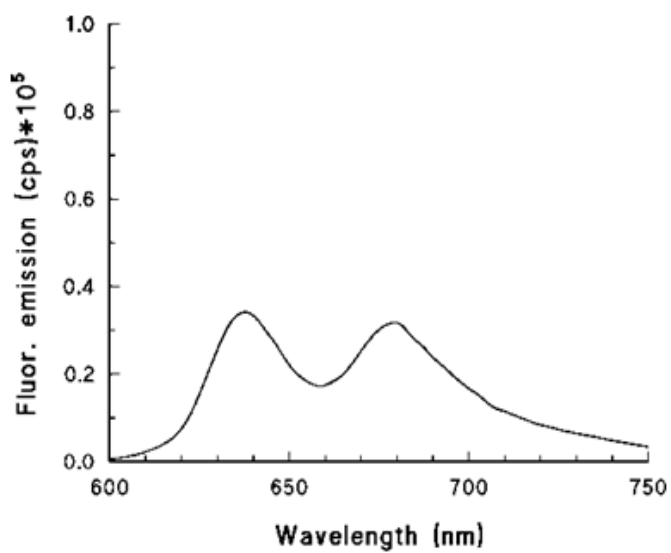
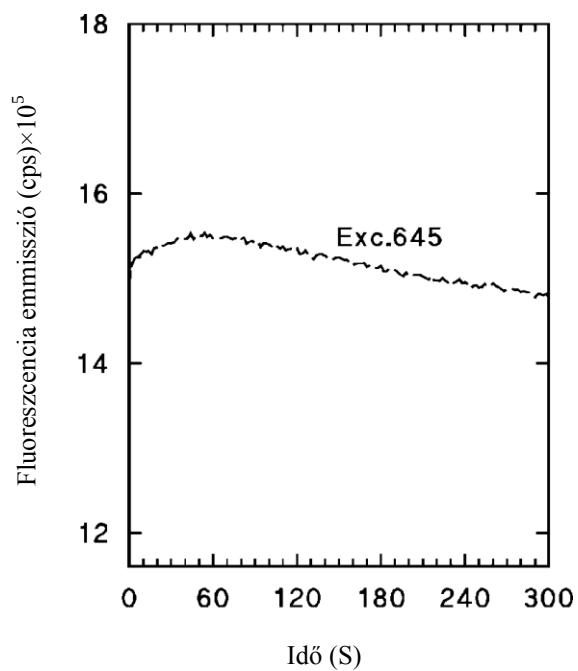
A 693,4 nm-es sáv korábbi munkák szerint erős korrelációt mutat a 632,4 nm-es komponenssel, ami vibrációs alsáv eredetét mutatja. A 718 nm-es komponens a 655 nm-es komponens vibrációs alsávja, amelyre szintén a két forma erős korrelációja utal.

A káposzta belső leveleiben lejátszódó folyamatok tanulmányozására a fluorométerben elhelyezett levéldarabokat a fluorométer monokromatikus gerjesztőfényével világítottuk meg. Az optikai rés 2 nm volt, a fény PFD értéke pedig $48 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. A megvilágítás alatt mértük a 680 nm-es emissziós jel intenzitásának változását az idő függvényében. A folyamatokat három kategóriába lehetett sorolni: 655 nm körüli fény hatására a 680 nm-es sáv intenzitása folyamatosan nőtt (10.a). ábra). 645 nm-es fény hatására a 680 nm-es sáv intenzitása mintegy 60 s-ig nőtt, majd lassú csökkenést mutatott (10.b) ábra). A 630 nm körüli fény a jel folyamatos csökkenését váltotta ki (10.c). ábra).

a)

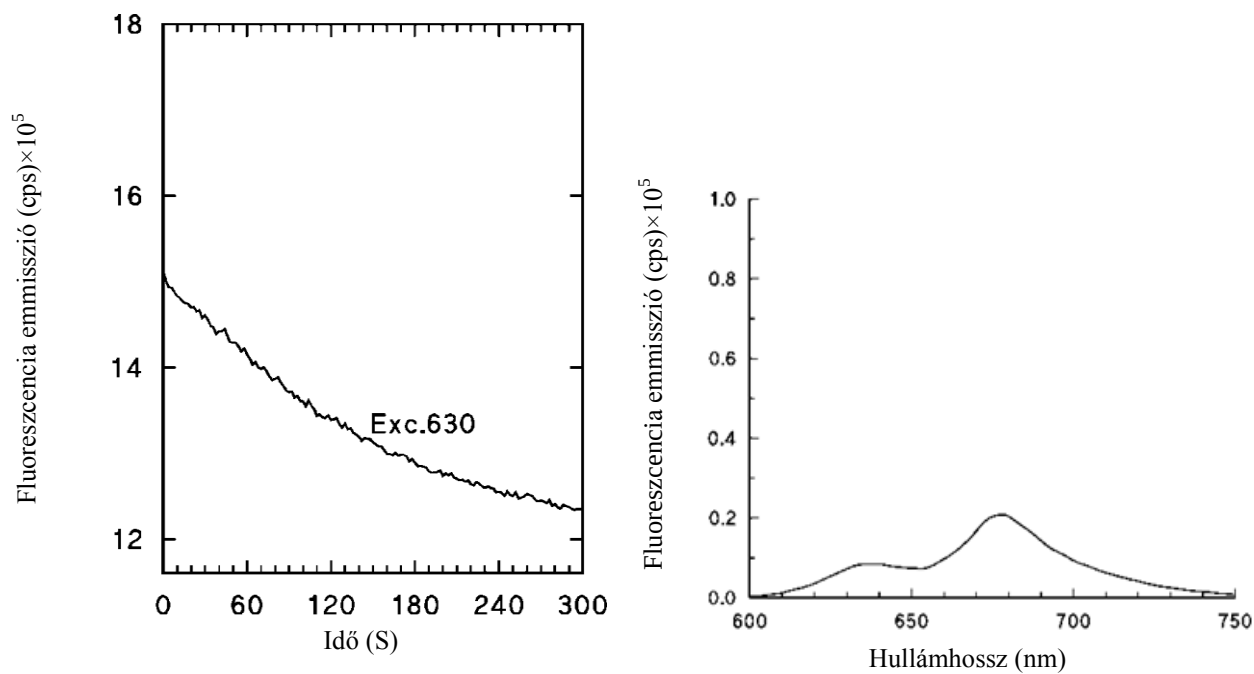


b)

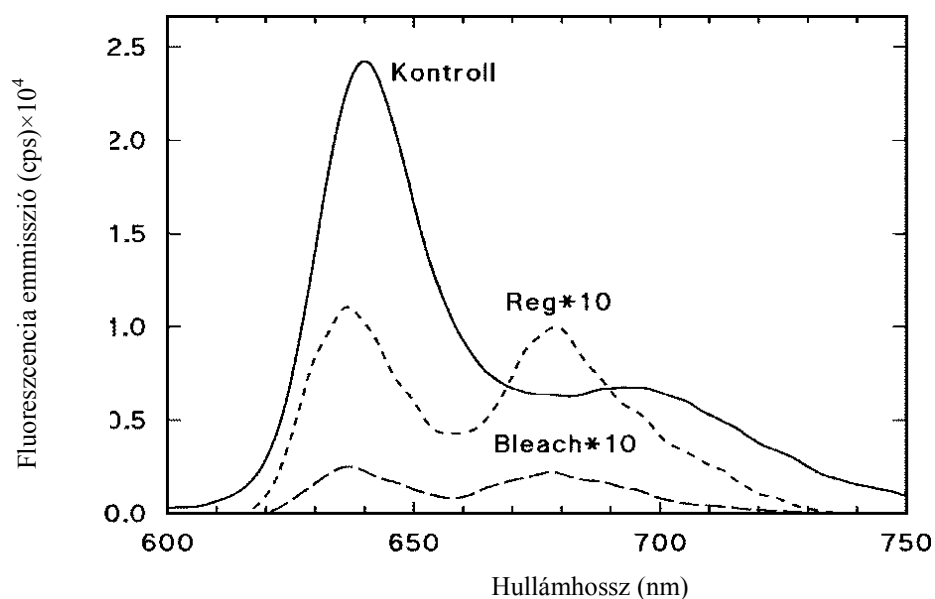


Fluorescence emission (cps) $\times 10^5$

c)



10.ábra: Különböző hullámhosszúságú fénnyel való 5 perces megvilágításkor felvett fluoreszcencia változás görbe, és kifakítás utáni fluoreszcencia spektrum



11. ábra: A levél megvilágítás előtti kontroll spektruma, a megvilágított minta, és a sötétben regenerálódott minta spektruma (utóbbi kettőt a jobb láthatóság kedvéért 10-el beszoroztuk)

A kifakított minták sötét-regenerációja

A megvilágítás hatására végbement kifakulást részben okozhatták a mintákban keletkezett fluoreszcencia kioltó vegyületek (olyan gyökök, amelyek a fotooksidációs folyamatok reakciósorozatában jönnek létre). Másrészt azt is meg akartuk vizsgálni, hogy az 5 perces megvilágítás mennyire volt lokális hatású, és mennyire roncsolta általában az egyéb sejtalkotókat. Ennek érdekében az 5 percig 632.5 nm-el megvilágított mintákat 3 óra hosszat sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubálás után mért spektrumban a sávintenzitások jelentős mértékben megnöttek. A protoklorofillid sávjainak növekedését *de novo* pigmentszintézis is okozhatta. A 680 nm körüli sáv megnövekedése valószínűleg annak köszönhető, hogy a sötét-inkubáció alatt a fluoreszcencia kioltó vegyületek vagy lebomlottak vagy vissza-redukálódtak, ugyanis sötétben klorofillid nem keletkezhetett *de novo*.

Hatásspektrum

A fentiekhez hasonló méréseket végeztünk 600 nm-től kezdve 2.5 nm-es lépésenként 660 nm-ig kiválasztott gerjesztőfényekkel.

A továbbiakban kiszámoltuk a teljes spektrum integrálértékét, valamint a 632,4, 642,9 és 655,9 és 680 nm-es maximummal rendelkező formák integrál értékeit. A megvilágító fény eltérő intenzitásait a xenonlámpa intenzitásváltozásának értékeit figyelembe véve normáltuk, azaz ezekkel az értékekkel a megvilágított minta spektrumának integrálértékeit felszoroztuk, így korrigáltuk az eltérő fényintenzitásoktól származó hibát, az értékek összehasonlíthatóvá váltak.

Kiszámítottuk az egyes komponensek mennyiségének változását a megvilágítás hatására. Az így kapott értékekből kiszámoltuk az integrál százalékos csökkenésének mértékét. A teljes spektrum integrálcsökkenését is kiszámoltuk, ami a bleaching intenzitását jelezte.

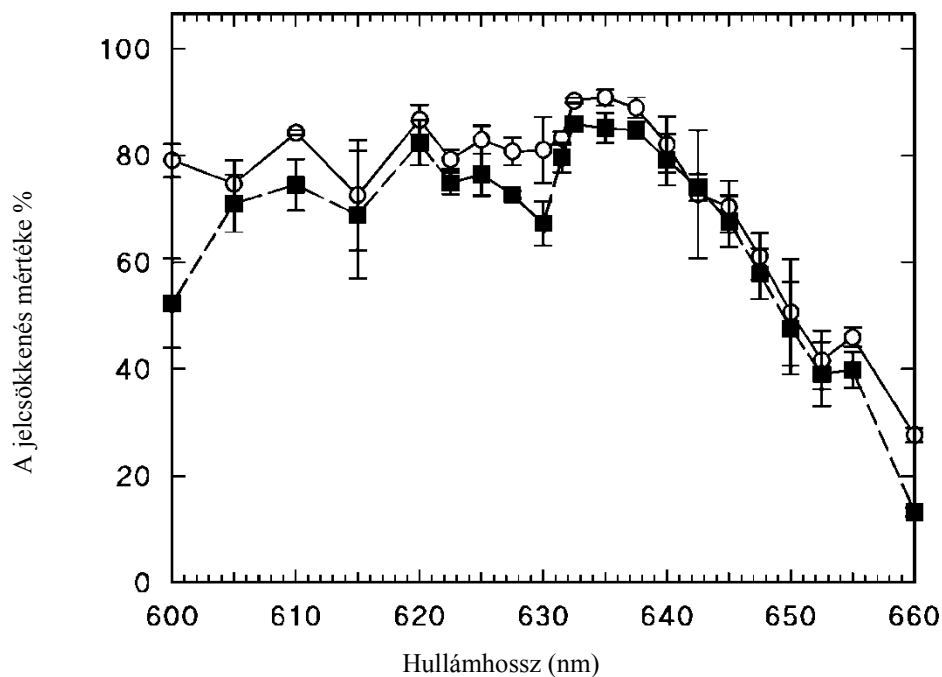
Az akcióspektrum elkészítése során egyes kiugró adatokat figyelmen kívül hagytunk ugyanis a szobahőmérsékleten mért fluoreszcencia spektrumok nagy interferencia jeleket, és egyéb (melegedésből és fotoelektronsokszorozóból származó) hibát tartalmaznak. Az általunk vizsgált minta fényérzékeny, így a gerjesztő fény intenzitását neutrális szűrővel csökkenteni kell. Emiatt a mérendő jel intenzitása kicsi, különösen a megvilágított spektrumoké amelyekben az összpigment-mennyiség is alacsonyabb. Ezek a tényezők összességében azt eredményezik, hogy sokszor a korrekció után is hibákkal terhelt spektrummal dolgozunk. A három párhuzamos mérés célja a mérésből származó hibák felismerése, és kontrollja. A hatásspektrumok kiszámításához összesen 300 spektrumot analizáltunk.

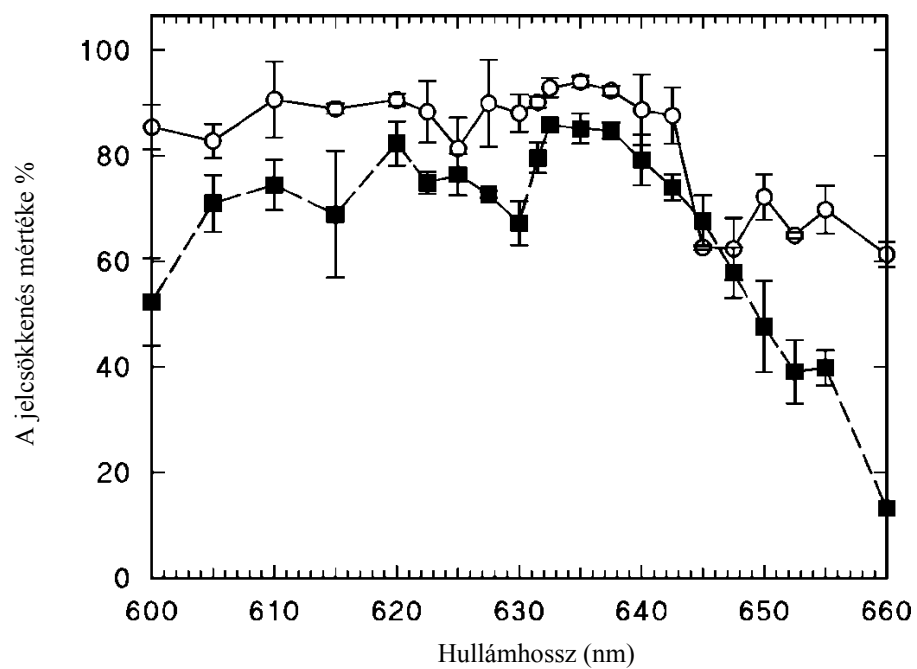
A három mérést átlagoltuk, ezeket az értékeket ábrázolja a 12. és 13. ábrán látható akcióspektrum. A 12. ábrán az összintegrálérték változását és a 632,4 forma változását ábrázoltuk. A bleaching folyamata során a reaktív oxigéngyökök a protoklorofillid és korofillid pigmentekkel reagálnak, amelyek oxidálódtak, szobahőmérsékleten nem fluoreszkáló származékokra bomlanak. Ez a jelenség a spektrum összintegrálértékének erős csökkenésével jár. A bleaching maximuma (87%) 631,5 nm és 635 nm között volt tapasztalható, ami igazolja feltevésünket, hogy a 632,4 nm-es forma játszott szerepet a folyamatban. A két akcióspektrum párhuzamos lefutása is ezt a feltételezést igazolta.

A 632 nm-nél rövidebb hullámhosszoknál megfigyel kifehéredés annak a következménye lehet, hogy a protoklorofillid komplexeknek rövidebb hullámhosszon széles vibrációs abszorpciós sávjai vannak, másrészt a komplexek Qx átmenetei is ebben a tartományban jelennek meg (Houssier és Sauer, 1969, 1970).

A 632,4 nm feletti hullámhossztartományokban kisebb mértékű bleaching volt tapasztalható, a magasabb hullámhosszú komponensek felől a gerjesztési energia nem adódhat át az alacsonyabb hullámhosszúságú komponensek felé, mert ez az energiamigráció energetikai feltételének nem felel meg.

12.ábra: A 632,4 nm hullámhosszúságú forma (fehér kör) és a spektrum összintegrál értékének (fekete négyzet) akcióspektruma





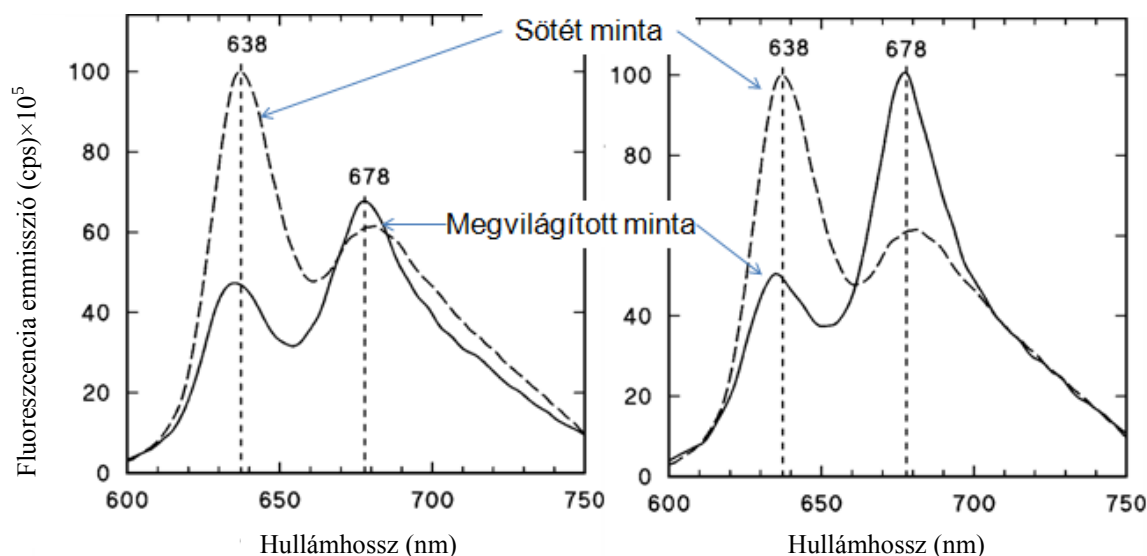
13. ábra: A 655,9 nm hullámhosszúságú forma (fehér kör) és a spektrum összintegrál értékének (fekete négyzet) akcióspektruma

A 13. ábrán a 655,9 nm-es fluoreszcenciájú enzinkötött oligomer forma, és a spektrum összintegrálérték változását mutatjuk be. A 655 nm-es forma felé az alacsonyabb hullámhossztartományok felől erős energiamigráció figyelhető meg. Ez azt jelzi, hogy a 642,5 nm-es forma az energiamigráció energetikai feltétele mellett megfelel a geometriai feltételnek is: mindkét forma a prolamelláris testek membránjához kötve fordul elő.

A 655 nm-es forma nem vesz részt a bleaching folyamatában, 655 nm hullámhossz megvilágítás hatására bleaching csak kis százalékban megy végbe. A 655 nm-es forma sávja viszont magas, ami klorofillid szintézissel magyarázható, mivel ez a folyamat nem jár az összintegrálérték csökkenésével.

Oxigénelvonás

Annak bizonyítására, hogy a pigment kifakulásában az oxigénnek szerepe van, olyan kísérletet végeztünk, amelyben a mintát olyan méretű leszívócsőben rögzítettük, ami behelyezhető volt a fluorométer mintatartójába is, így közvetlenül mérni lehetett a minta fluoreszcencia jelét. Ha vízlégszivattyúval 30 percig részleges vákumot állítottunk elő a leszívócsőben, a mintáról „sötét” spektrumot, majd megvilágítás után újabb spektrumot mértünk, a kifakulás elmaradását figyelhettük meg. Csökkentett oxigéntartalom mellett a 632.5 nm-es fény ugyan csökkentette a protoklorofillid sávok intenzitását, de ezzel párhuzamosan jelentős mértékben megnövelte a 678 nm-es emissziós sávét. Ez egyértelműen igazolta, hogy nem kifakítás, hanem a protoklorofillid fototranszformációja ment végbe. A rövid hullámhosszú sáv csökkenése nagyrészt a 644 nm-nél emittáló forma átalakulásának köszönhető (ezt bizonyítja a sáv kék felé történő eltolódása is), viszont nem tudjuk teljesen kizárni a kifakulást sem. A nagymértékű sávnövekedés 678 nm-nél azt mutatja, hogy klorofillid halmozódott fel, ami a 644 nm-es és a 655 nm-es formából is létrejöhetett. A 655 nm-es forma a rövid hullámhosszú formák által fluoreszkált fény reabszorpciója útján gerjesztődhetett. Az ugyanebben a rendszerben, természetes légköri nyomáson végzett kísérletben a 678 nm-es sáv intenzitása alig változott, tehát ebben az esetben kifakulás ment végbe.



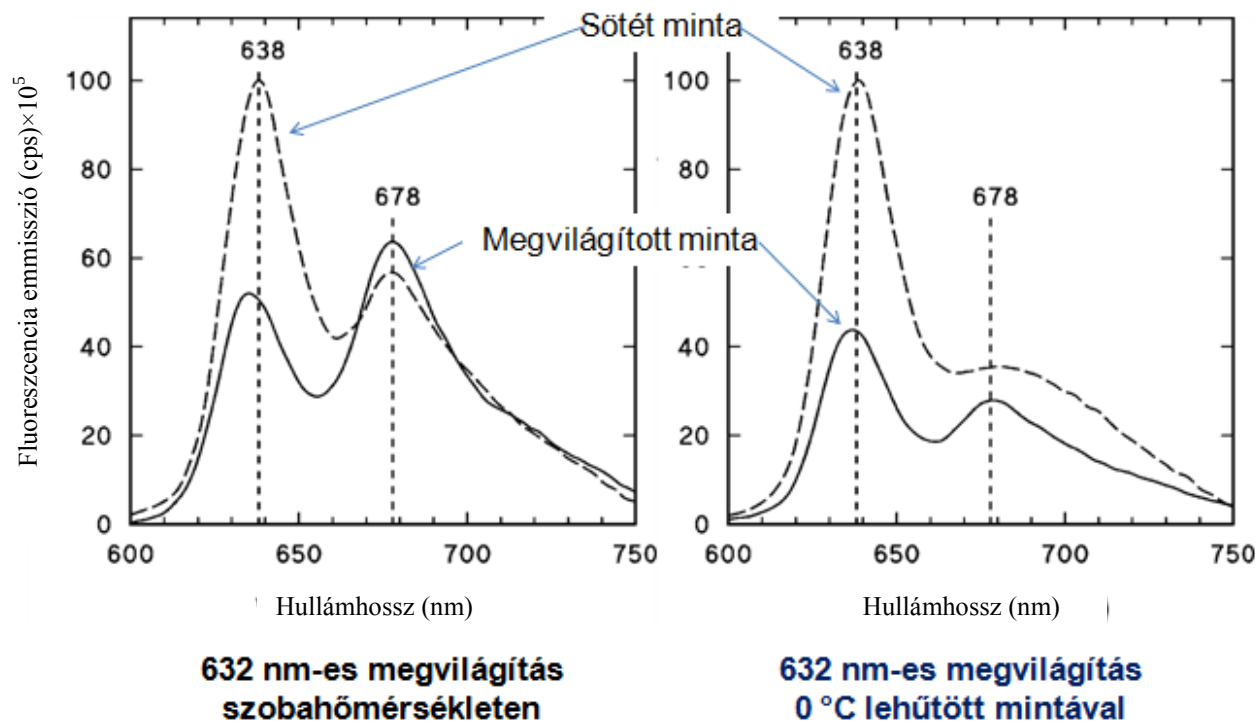
632 nm-es megvilágítás normál nyomáson

632 nm-es megvilágítás vákumban

14.ábra: 632.5 nm-rel megvilágított minta sötét és megvilágított spektruma kontroll és az oxigénelvonásos kísérlet körülményei mellett

A hűtés hatása

A protoklorofillid komplexei és a zöldülési folyamatok is membránhoz kötöttek. A biológiai membránok fluiditását a hőmérséklet nagymértékben befolyásolja; az alacsonyabb hőmérsékleten nagyobb rigiditású membránok pedig jobban sérülnek fotooxidációs folyamatokban (*Hideg és mtsai, 2010*). Ennek vizsgálatára káposzta belső leveleit 20 percig -4°C -on tartottuk sötétben, majd a spektrum mérése után 632.5 nm-es fénnel világítottuk meg. A megvilágítás után mért spektrumban jelentősen nagyobb mértékben (a spektrumok integráljait számítva mintegy kétszeresére) nőtt a kifakulás mértéke: a protoklorofillid sávintenzitása jelentősen csökkent, viszont a klorofillid sávintenzitása 678 nm-nél nem nőtt (14. ábra).



14.ábra: 632.5 nm-rel megvilágított minta sötét és megvilágított spektruma kontroll és hűtés hatására

A hűtött mintánkban magasabb volt az azonos tulajdonságú megvilágítás kiváltotta bleaching. A különbségi spektrum balrátolódását tapasztaltuk, ami azt jelzi hogy, nagyjából a 632,5 nm-es mennyisége csökkent a megvilágítás hatására és csak kisebb arányban a magasabb hullámhosszúságú formák. Szobahőmérsékleten a magasabb hullámhosszúságú formák (680 nm) mennyisége kisebb mértékben csökkent, itt ugyanis a keletkező klorofillid növelte, a fotodegradáció csökkentette a fluoreszcencia mértékét.

Következtetések

Fontos gyakorlati jelentősége miatt választottuk a fejeskáposztát, mint kísérletünk tárgyát. Piacokon, üzletekben a kereskedők gyakran leszedik a káposzta külső leveleit, hogy az frissebbnek tűnjön, de ezzel kiváltják a külső rétegek öregedését. Minél több levélrétegből áll a fejeskáposzta, annál kevesebb fény jut be a belsejébe, a 10. réteg alá gyakorlatilag már nem jut be fény, és a protoklorofillid-klorofillid átalakulás különböző állapotai figyelhetők meg. A legbelső rétegekben a protoklorofillid és a POR enzim monomer formája van többségben. A legkülső levelek olyanok, mint más növényfajokban a teljesen kifejtett zöld levelek. Kísérleteink igazolták, hogy: a monomer P632-es forma fényérzékeny, ez váltja ki a bleachinget. A reakciók hőmérsékletfüggőek, alacsony hőmérséklet növeli a fényérzékenységet. Az oxigén-elvonásos kísérletünkkel egyértelműen bizonyítottuk, hogy a pigmentek kifakulási folyamataiban az oxigénnek kulcsszerepe van. A kifakulási folyamatokban fluoreszcencia kioltó vegyületek is részt vehetnek, ezek sötét-regeneráció során eltűnnek, ami a fluoreszcencia sávok újbóli intenzitásnövekedésében játszik szerepet.

A fejeskáposzta jelentős antioxidáns-tartalommal rendelkezik (E- és C-vitamin, karotinoidok), amelyek a bleaching során keletkezett ROS-okat semlegesítik, ezáltal mennyiségük csökken, melynek egészségügyi vonatkozása van. A továbbiakban azt tervezzük, hogy részletesebben tanulmányozzuk a fejeskáposzta levelek antioxidáns rendszereit.

Irodalomjegyzék

- Beale, S. I. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60: 43–73.
- Böddi, B., Evertsson, I., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1996) Protochlorophyllide transformations and chlorophyll accumulation in epicotyls of pea (*Pisum sativum*). *Physiol Plant* 96: 706–713.
- Böddi, B., McEwen, B., Ryberg, M., Sundqvist, C., Protochlorophyllide forms in non-greening epicotyls of darkgrown pea (*Pisum sativum*) (1994). *Physiologia Plantarum* 92: 160–170.
- Böddi, B., Kis-Petik, K., Kaposi, A. D., Fidy, J., Sundqvist, C. (1998) The two spectroscopically different short wavelength protochlorophyllide forms in pea epicotyls are both monomeric. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365, 531–540.
- Böddi, B., Skribanek, A. (2001) Light- and cold-stress effects on the greening process in epicotyls and young stems of red oak (*Quercus rubra*) seedlings. *Tree Physiology* 21:549–554.
- Böddi, B. (2012) A kifakulás akcióspektrumának mérése káposztalevelek fotooxidációjának tesztelésére. A fluoromax-3 spektrofluorométer széleskörű használata (konferencia előadás). *Francelab Tudományos Napok*, Budapest
- Erdei, N., Barta, Cs., Hideg, É., Böddi, B. (2005) Light-induced wilting and its molecular mechanism in epicotyls of dark-germinated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol* 46: 185–191.
- Griffiths, W. T. (1978) Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J.* 15; 174: 681–692.
- Hideg, É., Vitányi, B., Kósa, A., Solymosi, K., Bóka, K., Won, S., Inoue, Y., Ridge, R.W., Böddi, B. (2010) Reactive oxygen species from type-I photosensitized reactions contribute to the light-induced wilting of dark-grown pea (*Pisum sativum*) epicotyls. *Physiologia Plantarum* 138:485–492.
- Houssier, C., Sauer, K. (1969) Optical properties of the protochlorophyll pigments II. Electronic absorption, fluorescence, and circular dichroism spectra. *Biochimica et Biophysica Acta* 172(3): 492–502.

- Houssier, C., Sauer, K. (1970) Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. *J. Am. Chem. Soc.* 92(4):779–791.
- Kahn, A., Boardman, N.K., Thorne, S.W. (1970) Energy transfer between protochlorophyllide molecules: Evidence for multiple chromophores in the photoactive protochlorophyllide-protein complex in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology* 48(1):85–101.
- Kósa, A., Márton, Zs., Böddi, B. (2005) Fast phototransformation of the 636 nm emitting protochlorophyllide form in epicotyls of dark-grown pea (*Pisum sativum* L.). *Physiologia Plantarum* 124, 132–142.
- Kósa, A., Márton, Zs., Solymosi, K., Bóka, K., Böddi, B. (2006) Aggregation of the 636 nm emitting monomeric protochlorophyllide form into flash-photoactive, oligomeric 644 and 655 nm emitting forms in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1757:811–820.
- Masuda, T., Fusada, N., Oosawa, N., Takamatsu, K., Yamamoto, Y. Y., Ohto, M., Nakamura, K., Goto, K., Shibata, D., Shirano, Y., Hayashi, H., Kato, T., Tabata, S., Shimada, H., Ohta, H., Takamiya, K. (2003) Functional Analysis of Isoforms of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44: 963–974.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lebedev, N., Apela, K. (1996) PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell*, 8: 763–769.
- Smeller, L., Solymosi, K., Fidy, J., Böddi, B. (2003) Activation parameters of the blue shift (Shibata shift) subsequent to protochlorophyllide phototransformation. *Biochimica Biophysica Acta* 1651: 130–138.
- Solymosi, K., Martinez, K., Kristóf, Z., Sundqvist, C. and Böddi, B. (2004) Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. capitata). *Physiologia Plantarum* 121:520–529.
- Reinbothe, C., Apel, K., Reinbothe, S. (1995) A Light-Induced Protease from Barley Plastids Degrades NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase Complexed with Chlorophyllide. *Molecular and Cellular Biology*, 15 (11): 6206–6212.

- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lebedev, N., Apel, K. (1996) PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell*. 1996 May; 8(5): 763–769.
- Sironval, C. and Brouers, M. (1970) The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. II. The temperature dependence of the P657-647→P688-676 phototransformation. *Photosynthetica* 4: 38–47.
- Szenzenstein, A., Kósa, A., Solymosi, K., Sárvári, É., Böddi, B. (2010) Preferential regeneration of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase oligomer complexes in pea epicotyls after bleaching. *Physiologia Plantarum*, 138: 102–112.
- Yang, J., Cheng, Q. (2004) Origin and Evolution of the Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase (LPOR) Genes. *Plant Biology* 6(5): 537–544.