

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A paraquat hatásának vizsgálata növényi mitokondriumokon

Képiró Anikó

Biológia BSc III. évfolyam

Témavezető: Dr. Zsigmond Laura

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

2012

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

ADP: adenzin-difoszfát

AOX: alternatív oxidáz

APX: aszkorbát peroxidáz

ASA: aszkorbinsav

ATP: adenzin-trifoszfát

DHA: dehidro-aszkorbinsav

GSH: glutation

GSSG: glutation-diszulfid

GR: glutation reduktáz

H₂O₂: hidrogén-peroxid

KCN: kálium-cianid

MDHA: monodehidro-aszkorbát

NADP⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát

¹O₂: szinglet oxigén

·O₂⁻: szuperoxid gyökanion

·OH: hidroxil gyök

SOD: szuperoxid dizmutáz

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	2
Tartalomjegyzék.....	3
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Arabidopsis thaliana.....	6
2.2. Mitokondrium.....	6
2.3. Oxidatív stressz.....	9
2.3.1. Az aszkorbinsav.....	9
2.3.2. Szuperoxid dizmutáz és kataláz.....	10
2.3.3. A glutation, a redukált glutation, és glutation reduktáz.....	10
2.4. Paraquat.....	11
3. Célkitűzések.....	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1. Sejtkultúra fenntartása.....	14
4.2. Mitokondrium izolálás.....	14
4.3. Enzimaktivitások fotometriás mérése.....	15
4.3.1. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérés.....	15
4.3.2. Glutation reduktáz aktivitás mérés.....	15
4.3.3. Hidrogén-peroxid kvantitatív meghatározása.....	16
4.3.4. Szuperoxid dizmutáz aktivitás mérése.....	16
4.3.5. Citokróm c oxidáz aktivitás mérés.....	16
4.4. Mitokondrium légzési vizsgálat.....	17
4.5. Fehérje koncentráció mérése.....	17
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	19
5.1. Szuperoxid dizmutáz aktivitásának mérése.....	19
5.2. Hidrogén-peroxid kimutatása.....	20
5.3. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérés.....	21
5.4. Glutation reduktáz aktivitás mérés.....	22
5.5. Citokróm c oxidáz aktivitás mérés.....	23
5.6. A mitokondriális légzési lánc.....	24
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	28

7. NYILATKOZAT.....	29
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	30
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	31

1. BEVEZETÉS

A növények alapvető fontosságúak az élet fenntartásához a Földön. A táplálék biztosításának képessége mellett az oxidatív légkör kialakításában is döntő szerepük van. Egyedfejlődésük során számos környezeti tényezőnek vannak kitéve, helyhez kötöttségük következtében pedig kénytelenek alkalmazkodni. A megfelelő alkalmazkodás hiánya a szaporodó képesség romlásához, extrém esetben az egyed pusztulásához is vezethet. A környezet egyes jellemzőihez csak korlátozott mértékben képesek alkalmazkodni, melyek lehetnek például a csapadékváltozás, a hőmérsékletingadozás, a tápanyaghiány; más tényezőkhez viszont már egyáltalán nem. Különböző stressz hatások érhetik őket, így például kiszáradás, oxidatív stressz, hőmérsékleti stressz, sóstressz. A stressz hatásokra adott válaszuk igen széles skálájú, az anyagcsere módosításoktól kezdve a különböző jelátviteli útvonalak módosításáig. Az oxidatív stresszre többek között enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokkal tudnak válaszolni, melyek megvédik őket az oxidatív károsodástól.

Az oxidatív stressz okozta változások következményeit már évek óta kutatják növényi mitokondriumokban. Különböző kutatások eredményei azt is valószínűsítik, hogy a paraquat, mely oxidatív stressz kiváltója lehet, befolyásolja a mitokondrium működését. Az általa kifejtett hatás mitokondriumon belüli pontos helyére még nem sikerült rábukkanni, ezért munkálataink célja az volt, hogy közelebb jussunk a probléma megoldásához. Sötétben tartott sejtekkel dolgoztunk, így a paraquat fotoszintézisre gyakorolt hatását ki tudtuk zárni, ezzel megkönnyítve vizsgálatainkat. Kísérleti növényünk a modellorganizmusnak is kiváló lúdfű, az *Arabidopsis thaliana* volt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

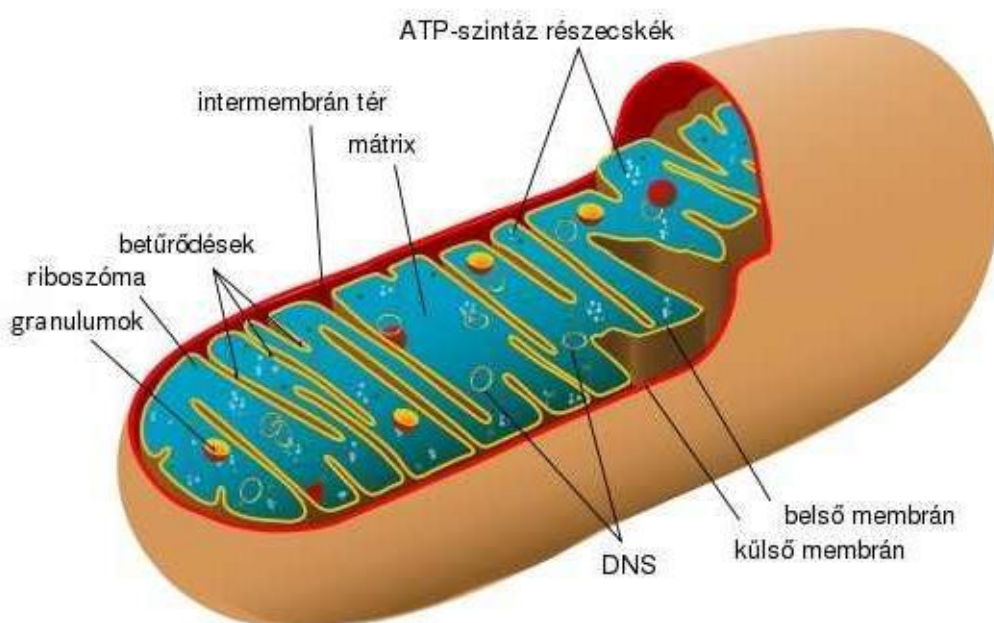
2.1. *Arabidopsis thaliana*

Az *Arabidopsis thaliana*, magyarul lúdfű, a keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjába tartozik (Koncz Csaba, Rédei György, 1999). Kiválóan alkalmas modellorganizmusként molekuláris biológiai, növénybiológiai, stressz élettani és genetikai kutatásokhoz, mivel rövid életidejű, olcsón termeszthető, önbeporzó, könnyen keresztezhető és kis méretű. Ezek a tulajdonságai a többi növényhez képest megkönnyítik a géntérképezést, a gének azonosítását, izolálását. Nagyszámú ökotípusa ismert (kb. 750) melyeknek germinációs ideje különbözik ugyan, de nagyjából 6-8 hét. A magasabbrendű növények közül elsőként fejeződött be a teljes genom nukleotid sorrendjének meghatározása 2000-ben. Kis méretű sejtmagi DNS-t hordoz, ami 5 pár kromoszómát képez, így a diploid *Arabidopsis* kromoszómaszáma 10. Haploid sejtmagi DNS-ének mérete kb. 100 Mb. Az egyes kromoszómákba csomagolt DNS-eknek a mérete 13,4 és 25,4 Mb között változik. Sejtmagi DNS-ének egy része "nem génikus", azaz nem kódol RNS-t. Genomjának 10%-a sokszorosan ismétlődő szekvencia, mely invertált ismétlődéseket tartalmaz. Az ismétlődő szekvenciák aránya rendkívül alacsony, emiatt a lúdfű DNS-ének G+C tartalma és C metilációjának szintje a magasabb rendű növények között a legalacsonyabb. A riboszómális RNS gének, melyeknek mérete kb. 10 kb., 570-szer fordulnak elő a 2. és a 3. kromoszómán egymás utáni ismétlődésként. Az *Arabidopsis* génekről szintetizálódó RNS-ek számát kb. 25.000-re becsülik (Bevan M, Walsh S., 2005). Ez azt jelzi, hogy kb. minden 2-7 kb távolságon van egy gén az *Arabidopsis*-ban. Körülbelül 25.000 génnel számolva egy átlagos *Arabidopsis* gén mérete megközelítőleg 4 kb. A lúdfű sejtmagi DNS-ének diploid kromoszómaszáma fejlődési stádiumonként ill. szövetenként megemelkedhet. Sejtosztódásának időtartama 8,5 óra. Az *Arabidopsis* kutatásban úttörő szerepe volt Rédei Györgynek, eredményei segítségével válhatott ez a növényfaj a genetikai kutatások modellorganizmusává.

2.2. Mitokondrium

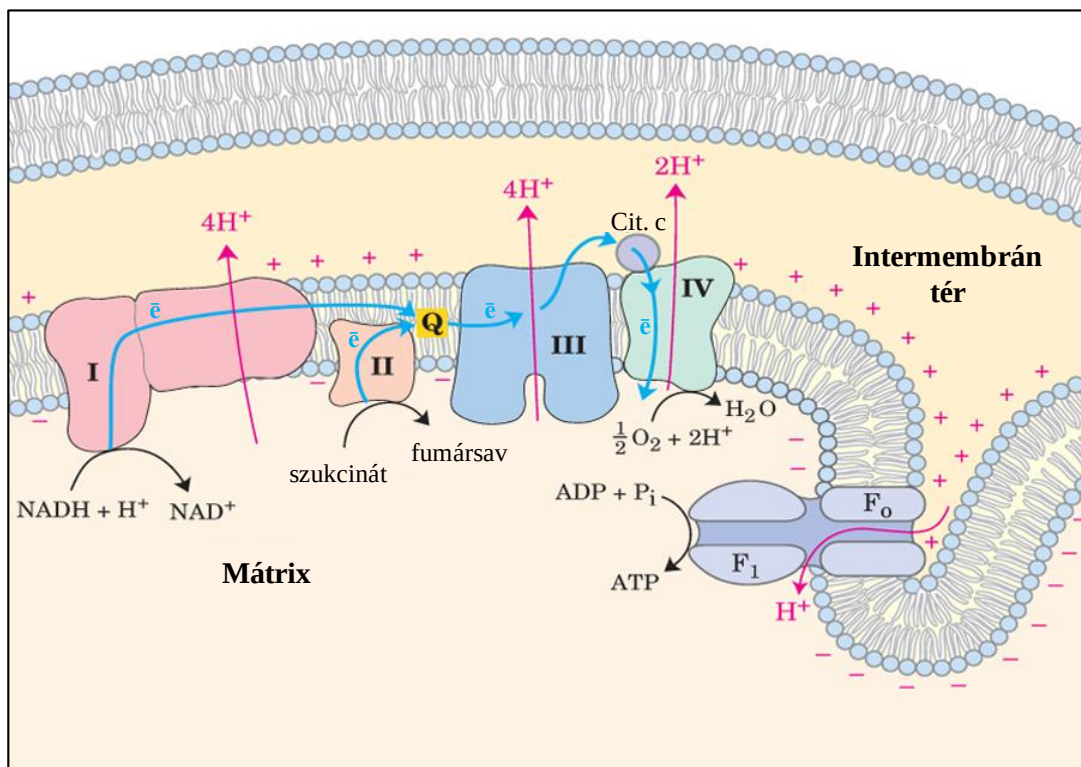
A mitokondriumok megtalálhatók minden eukarióta sejtben, funkciójuk a kémiai energia termelése és átalakítása (Novák Béla, 1994). Átlagosan 0,5 μm átmérőjű és 2 μm

hosszú sejtorganeliumok (Ádám Veronika, 2004). Származásukat tekintve az evolúció során a prokariótákból jöttek létre aerob baktérium és primitív anaerob eukarióta sejtek szimbiózisával. A mitokondriumokat két membrán határolja, egy belső és egy külső membrán. A külső membránt 50%-ban lipidek és 50%-ban fehérjék alkotják, a belső membrán 70%-ban fehérjékből áll, ami nem áteresztő valamennyi ionra nézve. A belső membrán határolja a mitokondriális mátrixot, ami sok fontos folyamatnak, mint például a Szent-Györgyi-Krebs ciklusnak vagy a zsírsav oxidációnak a közege. Itt helyezkedik el a légzési lánc elektronátvivő rendszere, valamint számos alapvető enzimrendszer.



2.1 ábra: A mitokondrium szerkezete (<http://www.wiki.vetphysiol.hu/MitokondriumOregedes>)

A FADH_2 -ről és a NADH -ról az elektronok és a protonok a belső membrán légzési láncának komponensein keresztül jutnak el az O_2 -re, és ennek hatására H_2O jön létre. A lánc komponensei protonokat pumpálnak ki a membránok közti térbe a mitokondriális mátrixból, ami elektrokémiai grádiens kialakulásához vezet, proton motoros erő generálódik. A protonok a mátrixba a mitokondrium belső membránján lévő ATP-szintázon keresztül juthatnak vissza. A mitokondriális légzési lánc fehérjéi 4 komplexet alkotnak.



2.2. ábra: A mitokondriális elektrontranszport lánc

(<http://inox.net/wp-content/uploads/2010/08/electron-transport.png>)

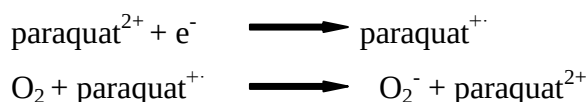
A láncba egyszerre két elektron lép be, mivel a folyamatban az elektrondonor a $\text{NADH} + \text{H}^+$, illetve a FADH_2 . Az I komplex, ami a lánc első komponense, a NADH-ubikinon-oxidoreduktáz 25 polipeptid láncból álló fehérje komplex, amely a mátrixban képződő NADH-t megköti és oxidálja. Az I komplexről az elektronok az ubikinonra vándorolnak, ami a III komplexhez szállítja azokat. A II komplex a szukcinát-ubikinon-oxidoreduktáz, ami szintén képes elektronokat átvinni az ubikinonra. Közvetlenül veszi fel az elektront, nincs protonpumpa aktivitása. A III komplex, vagy ubikinon-citokróm c oxidoreduktáz segítségével az elektronok a citokróm c-re kerülnek, amely egy vízdékony fehérje. A citokróm c-ről az elektronok a légzési lánc utolsó tagjához, a citokróm c oxidázhoz kerülnek, ami a IV komplex. A IV komplex az oxigén molekulát vízzé redukálja. Az V, vagy ATP-szintáz komplex, szorosan kapcsolódik az elektrontranszport láncához, annak ellenére, hogy nem tagja annak. A protonok ennek a komplexnek a fehérje csatornáján keresztül jutnak vissza a mátrixba. A mitokondriális elektrontranszport részt vesz a reaktív oxigénformák (ROS) termelésében, a láncban a fő helye az I és a III komplex. Egy, a növényi légzésben biokémiai szinten kialakult specifikus mechanizmus, az alternatív oxidázok elektron felvevő és továbbító szerepe, lehetővé teszi a növények számára, hogy jobban alkalmazkodjanak különböző stressz helyzetekhez. Az alternatív

oxidázok (AOX) fenntartják a citrát ciklus működését és az elektronáramlást oxidatív foszforiláció hiányában (Plaxton és Podestá, 2006). Ezt a folyamatot cianid rezisztens légzésnek nevezzük.

2.3. Oxidatív stressz

A növényeket számos stressz hatás (pl.: erős fényintenzitás, szélsőséges hőmérsékletek, szárazság, só vagy nehézfémek felhalmozódása) éri életük során. A különböző stressz hatások a sejten belüli redox állapot megváltoztatásával másodlagos oxidatív stresszt is eredményezhetnek (Láng Ferenc: Növényélettan). Az oxidatív stressz közvetlenül is érheti őket, és a növényekben végbemenő változások következtében az oxigén anyagcserében bekövetkező változások alatt nagymértékben reakcióképes oxigénformák keletkeznek. Ezek károsító hatásúak, és oxidatív stresszt okoznak. A leggyakrabban előforduló aktív oxigénformák a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), szuperoxid anion (O_2^-), a hidrogén peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök (OH^*). A növényeket érő stresszek következtében a megnövekedett mennyiségük oly mértékben károsító hatású lehet, hogy bekövetkezik a sejtalkotók oxidatív destrukciója. A gyökök képződését kiválthatja egy herbicid, a paraquat, amely elektront felvéve gyökké alakul a fotoszintézis I-es fotorendszerének redukáló oldalán. A paraquat szuperoxid-anion gyököket generál, ha molekuláris oxigénnel reagál.

A paraquat indukálta szuperoxid gyökképződés:

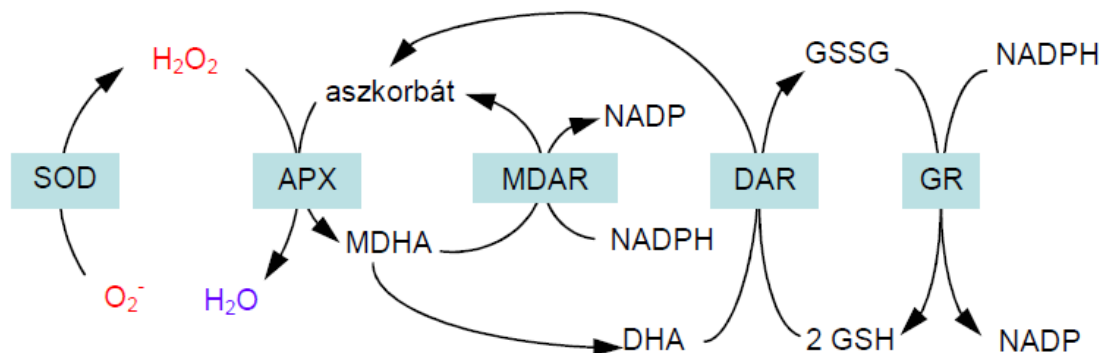


A növényi sejtek enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokkal rendelkeznek, melyek a ROS-okat semlegesíthetik, szabályozzák a ROS termelő folyamatokat, valamint szerepük van a ROS jelátvitelében.

2.3.1. Az aszkorbinsav

Az aszkorbinsav vagy C-vitamin, ami egy nem enzimatis antioxidáns, nagyon magas koncentrációban fordul elő a növényi sejtekben (Noctor és Foyer, 1998). Döntő szerepet játszik a sejtben a redox egyensúly és anyagcsere szabályozásában. Nagy mennyiségben fordul elő a kloroplasztisban, részben pedig a mitokondriumban, és elszórva a sejtben. Az aszkorbát redukált formában található meg a mitokondrium mátrixában (Jimenez és mtsai., 1997, Teixeira és mtsai., 2006). A mitokondriumba teljesen oxidált, dehidro-aszkorbinsav

(DHA) formában lép be (Szarka és mtsai., 2004). Az aszkorbinsav aszkorbát peroxidáz (APX) felhasználásával redukálja a hidrogén-peroxidot vízzé. Ez a Halliwell-Asada ciklus (3. ábra). Az aszkorbát peroxidáz az aszkorbinsavat átalakítja monodehidro-aszkorbáttá, ami dehidroaszkorbáton vagy közvetlenül képes visszaredukálni aszkorbáttá. Az aszkorbinsav elektrondonorként szolgál az aszkorbát peroxidáz számára.



2.3. ábra: Az aszkorbát redox ciklusa a kloroplasztiszban (Halliwell-Asada ciklus)

SOD: szuperoxid dizmutáz; APX: aszkorbát peroxidáz; MDAR: monodehidro-aszkorbát reduktáz; DAR: dehidroaszkorbát reduktáz; GR: glutation reduktáz; H_2O_2 : hidrogén-peroxid; NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát; GSSG: oxidált glutation; NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát hidrogén; O_2^- : szuperoxid gyökanyon; MDHA: monodehidro-aszkorbát; DHA: dehidroaszkorbát; GSH: redukált glutation

2.3.2. Szuperoxid dizmutáz és a kataláz

A szuperoxid dizmutáz (SOD) olyan fém tartalmú enzim, amely a rendkívül reaktív szuperoxid (O_2^-) átalakítását végzi. Megkülönböztetünk mangán tartalmú (MnSOD), vas tartalmú (FeSOD) és réz/cink tartalmú (Cu/ZnSOD) szuperoxid dizmutázt. A MnSOD, ami a peroxisómában és a mitokondriumban található, katalizálja az O_2^- redukcióját vízzé. Az FeSOD legfőképpen a kloroplasztiszban fordul elő, míg a Cu/ZnSOD a mitokondriumban, citoplazmában és a kloroplasztiszban. A kataláz enzimek a mitokondriumokban, glioxiszómákban és peroxisómákban fordulnak elő. Ezekben a kompartmentekben a H_2O_2 koncentrációját csökkentik.

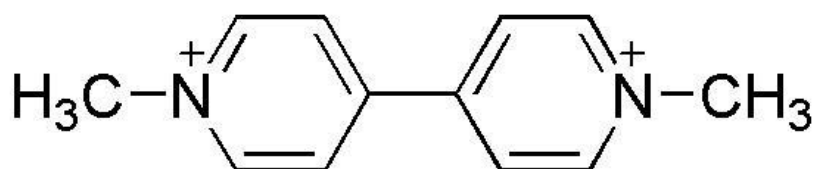
2.3.3 A glutation, a redukált glutation és a glutation reduktáz

A glutation (GS) képes közvetlen reakciókra a reaktív oxigén formákkal, hasonlóan az aszkorbinsavhoz. A sejtekben legnagyobb részben a redukált formája (GSH) található

meg. A mitokondriális mátrix nem tartalmazza a GSH szintézis útvonalat, annak ellenére, hogy sok GSH-szintetáz található a mitokondriumban. (Moran és mtsai., 2000) A GSH fő szerepe a fehérjék védelmezése az oxidatív kárral szemben. A glutationált fehérjék inaktívak. A glutation oxidált formája, a GSSG megnövekszik oxidatív stressz hatására. A GSSG redukálását GSH-vá a glutation reduktáz (GR) végzi.

2.4. Paraquat

A paraquat egyike volt a legelterjedtebb herbicideknek a világon (Darvas Béla, 2000) Először 1958-ban fedezték fel. Mérgező hatású emberre és állatokra is. Bőrön keresztül és belélegezve is rendkívül veszélyes, tüdőödémát okoz. Olyan méreg, mely ellen nincs ellenszer, felszívódása biztos halált okoz.



2.4. ábra: A paraquat képlete

(Forrás: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Paraquat>)

Hazánkban az 1960-as években vált az öngyilkosok kedvencévé. A madarakban az egyik legsúlyosabb fejlődési rendellenességeket, tüdő- és agyfejlődési zavarokat okoz. Gyorsan hat, megöli a zöld növényi szöveteket. Természetes körülmények között színe fehér, kristályos anyag (Ross és Krieger 1980). Vízben jól oldódik, szerves oldószerekben viszont oldhatatlan. Bomlása során, melyet UV sugárzás katalizál, 4-karboxil-1-metil-piridinium-klorid keletkezik. A fotoszintetikus elektrontranszport lánc FeSx komponenséhez bekapcsolódva eltereli az elektronokat fiziológias útvonalukról, majd azokat felveszi, és paraquat kation gyökké alakul át (Fujii és mtsai, 1991). Elektronok hiányában kevesebb NADH termelődik, és a keletkezett paraquat kation gyökök a kloroplasztisban molekuláris oxigénnel reagálva szuperoxid anion gyököket generálnak, míg maguk regenerálódva visszaalakulnak paraquat kationná. A szuperoxid anion gyökök hidrogén-peroxidot képezhetnek (Babbs és mtsai, 1989). A képződött hidrogén-peroxid gyökök hidroxilgyököket is létrehozhatnak további szuperoxid anion gyökök mellett. A paraquat a növény felszínére kerülve, gyorsan, fél-másfél órán belül penetrálódik a

növénybe. Mivel a paraquat a folyamathoz szükséges elektronokat a fotoszintetikus elektron transzportláncból veszi el, ezért a hatás nagymértékben függ a fényintenzitástól. Alacsonyabb fényintenzitás vagy alacsonyabb hőmérséklet elősegíti a herbicid szétterjedését a növényben (Hunyadi és Almádi, 1981, Halász és mtsai). A paraquat gerjesztette oxidatív stressz a glutation (GSH) elektron átadásán keresztül a szabadgyökök redukciójában küszöbölődik ki (Bittsánszky és mtsai, 2008).

A paraquat igen széles körben alkalmazott vegyület, ami strukturális hasonlóságot mutat egy manapság igen nagymértékben tanulmányozott neurodegeneratív betegség, a Parkinson-kór toxinjával, az 1-metil-4-fenilpiridiummal (Pablo R. és mtsai, 2007). A Parkinson-kór egy olyan rendellenességet okoz az agyban, amely során részben létrejön a reaktív oxigén gyökök túltermelődése, ami mitokondriális működési zavarhoz és oxidatív stresszhez vezet. Tanulmányok arra következtetnek, hogy a paraquatnak nagy szerepe lehet a betegség kiváltásában. Ez megnövelte az érdeklődést eme gátló hatású anyag vizsgálatának irányában.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Állati szervezetekben régóta tanulmányozzák a paraquat mitokondriumra gyakorolt hatását. Növények esetében is széles körben alkalmazzák mind *in vivo*, mind *in vitro* kultúrákban oxidatív stressz kiváltására, miközben hatásmechanizmusát eddig leginkább csak kloroplasztiszban tanulmányozták. Habár a paraquat növényi mitokondriumra kifejtett hatását évek óta valószínűsítik, igen kevés ismeret áll rendelkezésünkre a pontos működéséről az organellumban. Az állati és a növényi szervezetek analógiája alapján a mitokondriális elektrontranszport láncot befolyásoló hatását valószínűsítene, bár a növények mitokondriális légzésében az állati rendszerekhez képest eltérés is van (pl.: alternatív oxidázok).

Dolgozatomban ezen gátló hatású herbicidet vizsgálom, hogy hogyan befolyásolja a sötétben nevelt *Arabidopsis thaliana* teljes növény eredetű sejtszuspenziós kultúrából izolált mitokondriumot és a mitokondriális légzési lánc komplexeit, különböző mérési módszerekkel. Az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- A paraquattal kezelt minták esetében változott-e a H_2O_2 tartalom?
- Ha történik változás, ez milyen irányban befolyásolta az antioxidáns rendszer néhány elemét?
- Az elektrontranszport lánc komponenseinek az aktivitása megváltozik-e?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Sejtkultúra fenntartása

Kísérleteink során *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípus, vad típusú teljes növény eredetű sejtsuszpenziós kultúrával dolgoztunk. A sejtkultúra fenntartásához Encina és munkatársai (2001) által kidolgozott módszert alkalmaztuk. Az alap MS tápoldatot (Murashige és Skoog, 1962) kiegészítettük 0,2 g/l mioinozitolal, 30 g/l szacharózzal és hormonokkal (0,5 mg/l 6-benzil-aminopurin, 1 mg/l indol-3-ecetsav, 1 mg/l naftalinecetsav, 1 mg/l 2,4-diklórfenoxiecetsav). A tápoldatot hetente cseréltük úgy, hogy a sejtkultúrából minden héten kivettünk 5-5 ml-t két új lombikba, melyeket kiegészítettünk 45-45 ml friss tápoldattal. Ezután sötétben, percenként 120 fordulatszámmal rázattuk.

4.2. Mitokondrium izolálás

Hat napos kezeletlen és 22 órán át 0,1 μ M paraquattal kezelt *Arabidopsis* sejtsuszpenziós kultúrából Werhahn és munkatársai (2001) által leírt módon izoláltunk ép mitokondriumokat. Az 50 g szárazra szűrt sejtsuszpenzióhoz 100 ml jéghideg feltáró puffert (450 mM szacharóz, 1,5 mM EGTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,6 % [w/v] PVP 40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 15 mM MOPS, pH 7,4) adtunk. A sejteket turmixgéppel homogenizáltuk 3 periódusban 15 másodperces mixelési szakaszokkal. Az így kapott oldatot $\sim$ 100 μ m pórus átmérőjű szöveten átszűrtük. Ezt követően 3 lépcsős centrifugálás következett: két centrifugálás 5 percig (3000 g) a felesleges törmelék ülepitésére, és egy 10 perces centrifugálás (17000 g) a mitokondriumok ülepitésére. Ezután a mosó pufferben (300 mM szacharóz, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF és 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2) újra feloldottuk a mitokondriumokat. Ezt követően egy 3 lépcsős Percoll grádienszt építettünk az ép mitokondriumok elválasztásához, amely 18%, 23 % és 40% Percollt tartalmazott 0,3 M szacharóz és 10 mM MOPS/KOH (pH 7,2) mellett. A mintákat a grádiensek tetejére rétegeztük, és az 50 perces nagy sebességű (70.000 g) centrifugálás után a mitokondriumok a 23%-os és a 40 %-os fázis határán helyezkedett el. Ezután eltávolítottuk a Percoll-t a megtisztított mitokondriumról, majd kétszer mostuk a feloldó pufferrel (0,4 M mannitol, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, és 10 mM K-foszfát, pH 7,2) és 15 percig centrifugáltuk (12000g). Az így kapott mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.3. Enzimaktivitások fotometriás mérése

A különböző enzimek aktivitásának a méréseit három vagy több biológiai ismétléssel végeztük. A statisztikai analízishez a Microsoft Office Excel 2007-es verzióját használtuk, amivel Student t-próbát végeztünk.

4.3.1 Aszkorbát peroxidáz aktivitásmérés

Az APX aktivitásának a mérése Nakano és Asada (1981) módszere alapján történt. A növényi mintákat folyékony nitrogénben eldörzsöltük és homogenizáló puffert adtunk hozzá, amely tartalmazott: 50 mM K-foszfát puffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% PVP-40 és 1 mM aszkorbinsav. Ezután 20 percig 4°C-on 14.000 rpm sebességgel centrifugáltuk a mintákat. A centrifugálás után a felülúszót használtuk enzimkivonatként. A méréshez kvarc küvettát használtunk. 1 ml végtérfogatban belemértünk 900 µl 50 mM K-foszfát puffer (pH 7.0), 10 µl 100 mM aszkorbinsav oldatot, 50 µl enzimkivonatot és 40 µl 50 mM H₂O₂ oldatot. Az abszorpcióváltozást 290 nm-en mértük 2 percig. Az egységnyi APX aktivitáson azt az enzim mennyiséget értjük, ami képes 1 µM aszkorbinsavat 1 perc alatt oxidálni. Az APX moláris extinkciós koefficiense 290 nm-en 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹, az enzim specifikus aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.3.2. Glutation reduktáz aktivitásmérés

A reakció az enzim működése során keletkező GSH kimutatásán alapul. Színes termék, tionitrobenzoesav keletkezik 5,5-ditiobisz(2-nitrobenzoesav) (DTNB) hozzáadásával, ezt tudjuk mérni 412 nm-en. A növényi mintákat folyékony nitrogénben eldörzsöltük és homogenizáló puffert adtunk hozzá (50 mM K-foszfát, 1 mM EDTA, 1% PVP-40, pH 7.0), majd a mintákat centrifugáltuk. A glutation reduktáz (GR) aktivitásának méréséhez az 1 ml reakcióelegy 550 µl 100 mM K-foszfát puffer (pH 7.0), 50 µl 2 mM NADPH-t, 50 µl 20 mM GSSG-t, 100 µl fehérjét és 250 µl 3 mM DTNB-t tartalmazott. Ezután lezártuk a reakcióelegyet parafilmmeel, és összeráztuk. Fél perc elteltével kezdtük mérni az abszorpcióváltozást 412 nm-en a harmadik perc végéig. A mintákat GSSG nélküli kontrollal szemben mértük. A kapott adatokból kiszámoltuk azt az enzimmennyiséget, amely katalizálja 1 µmol GSSG redukcióját egy perc alatt. Az enzim specifikus aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.3.3. Hidrogén-peroxid kvantitatív meghatározása

A H_2O_2 tartalom és képződés mérését sejtszuspenziós kultúrából és izolált mitokondriumból Dlasková és munkatársai (2006) által leírt módon végeztük Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-et használva (Invitrogen, Molecular Probes, A22188). A sejtszuspenziós kultúrából vett mintákat szárazra szűrtük, folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd tömegükhöz képest négyszeres térfogatú 20 mM K-foszfát puffert (pH 6,5) adtunk hozzá és 20 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A felülúszót használtuk H_2O_2 tartalom meghatározásához. A kb. 200 µg tömegű izolált mitokondriumot 10 mM K-foszfát (pH 7,2), 0,4 M mannitol, 5 mM glutamát, 5 mM szacharóz, 5 mM almasav, 1 mM aszkorbinsav, 0,2 U/ml torma peroxidáz és 50 µM Amplex Red reagenst tartalmazó oldatban oldottuk fel. Ezt követően az elegyet sötétben tartottuk szobahőmérsékleten 30 percig, majd megmértük a resorufin akkumulációját 560 nm-es hullámhosszon, (Thermo Labsystems, Multiskan Spectrum), és kalibrációs görbével határoztuk meg a H_2O_2 tartalmat.

4.3.4. Szuperoxid dizmutáz aktivitásának mérése

A SOD aktivitásának a meghatározásakor azt használtuk fel, hogy az enzim gátolja a 4-nitro-tetrazoliumkékből (NBT) O_2^- jelenlétében a formazán képződését (Dhindsa és mtsai., 1981). A növényi mintákat folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd felvettük 50 mM K-foszfátot (pH 7.0), 1 mM EDTA-t és 1% PVP-40-t tartalmazó pufferben. Az így kapott homogenizátumot centrifugáltuk (14000 g). A felülúszót használtuk az enzim aktivitásának mérésére. Az 1 ml végtérfogatú reakcióelegy 900 µl 100 mM K-foszfát (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin oldatot, 33 µl 5 mM NBT-t, 30 µl enzimkivonatot és 33 µl 0,2 mM riboflavint tartalmazott. Ezzel 3-4 párhuzamost mértünk össze, a mintákat pedig intenzíven megvilágított helyen tartottuk. A vak oldat nem tartalmazott enzimet. Egy sötétben tartott sorozatot is beállítottunk referenciaként. 15 perc elteltével a keletkezett formazán fényelnyelését mértük 560 nm-en. Végül az 50 %-os NBT gátlást eredményező enzimegységet 1 mg fehérjére vonatkoztatva adtuk meg.

4.3.5. Citokróm c oxidáz aktivitásmérés

Ezt a módszert Szarka és munkatársai (2004) által leírtak szerint végeztük. A méréshez spektrofotométert használtunk 550 nm hullámhosszon. A 0,053 mg/ ml citokróm c oldatot beletöltöttük 1 ml-es műanyag küvettába, felvettük az alapvonalat, majd 0,1 M-os Na-ditionittal redukáltuk. A Na-ditionitot apránként adagoltuk az abszorbancia folyamatos

figyelésével, és amikor már nem változott a színe az oxidált oldattal szemben, akkor tekintettük teljesen redukáltnak a citokróm c oldatunkat. Az abszorbancia változásából tudjuk az enzim aktivitását számolni, mivel a mérés nem végpontos. A redukált citokróm c oldat abszorbanciáját fél percen keresztül felvettük, majd hozzáadtuk a mitokondriális preparátumot, és 2 percig figyeltük a változást. A mitokondrium épségét az enzim latenciájával jellemezhetjük, ezért a mérést elvégeztük tritonnal kezelt mitokondriumokkal is. Mérés előtt 1 ml citokróm c oldathoz 25 µl 1 %-os Triton-X-100-at adtunk. Az enzimaktivitást a Lambert-Beer törvény segítségével számoltuk ki (moláris extinkciós koefficiense 550 nm-en $20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 1 mg fehérjére vonatkoztatva.

4.4. Mitokondriális légzési vizsgálatok

Ezeket a vizsgálatokat Ho és mtsai (2007) által leírt módon végeztük, kis mértékű módosításokkal. Az izolált mitokondriumot légzési pufferbe tettünk (0,4 M mannitol, 0,25 % BSA, 10 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2 mM MgSO_4 , pH 7,35) és az oxigénfogyasztást 22 °C-on mértük Clark típusú oxigén elektróddal (Hansatech CB1D). Az alábbi légzési szubsztrátokat és gátlószereket használtuk a következő koncentrációkban: NADH (1.5 mM), ADP (0.2 mM), ATP (0.3 mM), dithiothreitol (2 mM), piruvát (5 mM), rotenon (10 µM), szukcinát (5 mM), antimycin A (10 µM), aszkorbinsav (1 mM), KCN (1 mM), SHAM (2 mM). Az oxigénfogyasztást ADP jelenlétében, valamint nélküle is megmértük. ADP hiányában lassabb az oxigén fogyasztás, hozzáadásakor viszont többszörösére nőhet. Az így mért sebességek arányát respirációs kontroll hányadosnak nevezzük. A III komplex aktivitására annak antimycin A-val történő fokozatos gátlásából és az ebből eredő csökkenő oxigénfogyasztásból következtettünk.

4.5. Fehérje koncentráció mérése

Az izolált mitokondriumok fehérje tartalmát Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg a BioRad cég által gyártott fehérje meghatározó készlettel a megadott leírás szerint. A méréshez spektrofotométert használtunk 595 nm hullámhosszon. 1 ml reakcióelegy 798 µl desztillált vizet, 2 µl mitokondrium preparátumot és 200 µl koncentrált reagenst (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, #500-0006) tartalmazott.

Minden alkalommal legalább 3-3 párhuzamos mintát mértünk meg. A mért abszorbancia értékekből kalibrációs görbe segítségével számoltuk ki a fehérjeoldatok koncentrációját.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

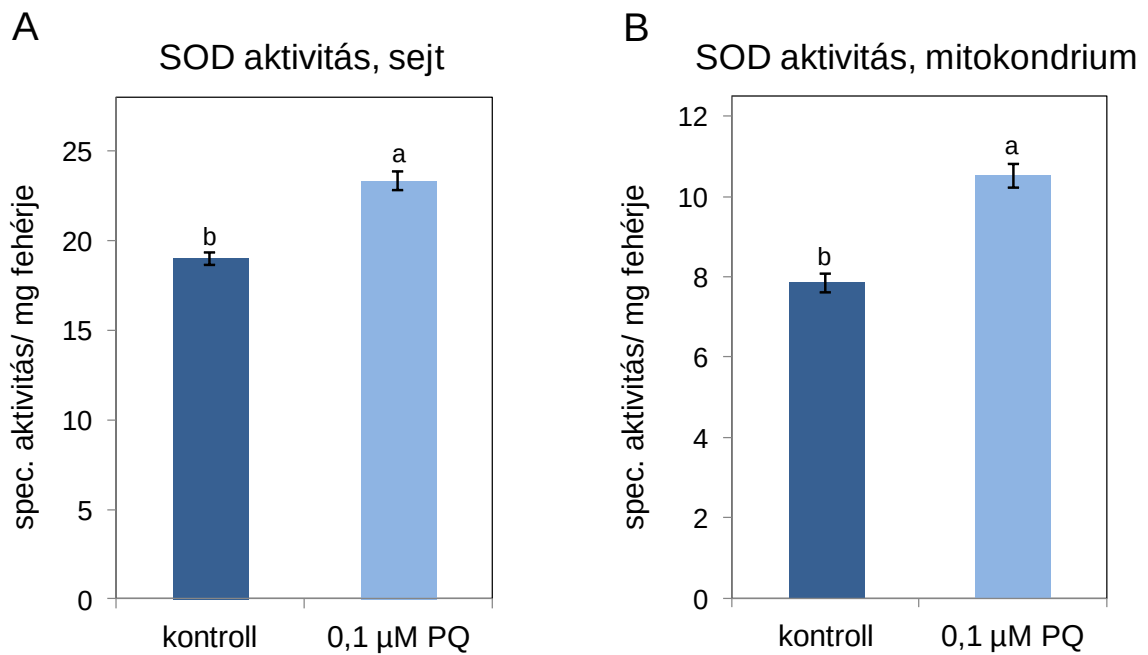
Kísérleteink során teljes növény eredetű, de sötétben nevelt sejtszuszpenziós kultúrával dolgoztunk annak érdekében, hogy a paraquat kloroplasztizsra gyakorolt hatását kiküszöböljük. A mérések során $0,1 \mu\text{M}$ végkoncentrációban 22 óra időtartamban alkalmaztuk a paraquatot, mivel munkacsoportunk előzetes eredményei alapján ez volt az optimális kezelési körülmény, amely még nem okozott letalitást, viszont már stresszt váltott ki. A stressz kezelés után a szuszpenziós kultúrákat gondosan szárazva szűrve használtuk, hogy a tömegük mérése során minél pontosabb eredményeket kaphassunk. A különböző méréseket háromszor megismételtük (biológiai ismétlés) legalább három-három párhuzamos mintával.

5.1. Szuperoxid dizmutáz aktivitás mérése

A szuperoxid a mitokondriális SOD (MnSOD) hatására elektront felvéve nagyon gyorsan H_2O_2 -dá alakul (Dr. Sipos Ildikó, 2003). Szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben, az enzimatis védelem első vonalát képviseli az intracelluláris szabad gyökök kioltásában, ezért először ennek az enzimnek az aktivitását vizsgáltuk meg paraquat hatására. A SOD a többi antioxidánsal együtt képes igazán kifejteni hatását (Ji L. L. és mtsai, 2000). A méréskor a mitokondrium preparátumhoz K-foszfát puffert, EDTA-t, metionin oldatot, NBT-t, és riboflavint adtunk az enzim optimális működése érdekében.

A kísérletek során a SOD aktivitásában 23%-os növekedés volt tapasztalható (5.1. A ábra) a paraquattal kezelt mintákban a kontrollhoz képest abban az esetben, mikor a teljes sejtet vizsgáltuk. Az izolált mitokondriumban (5.1. B ábra) 33%-kal nőtt meg a MnSOD specifikus aktivitása a kezeletlen mintákhoz képest. Az izolált mitokondriumoknál nagyobb különbséget figyelhettünk meg, mint a teljes sejt mintákban, amiből arra következtethetünk, hogy a paraquat által kiváltott stressz kezelés hatására az elsődleges szuperoxid anion képződés helye sötétben nevelt szuszpenzió esetében a mitokondrium volt, és szuperoxid anionok mennyisége jelentősen megnövekedhetett.

A megnövekedett SOD enzim aktivitásból a H_2O_2 fokozott jelenlétére következtethetünk, ami egyrészt az oxidatív stressz velejárója lehet, másrészt önmagában is másodlagos oxidatív stresszt válthat ki. Ennek bizonyítására H_2O_2 kimutatására alkalmas kísérleteket végeztünk.



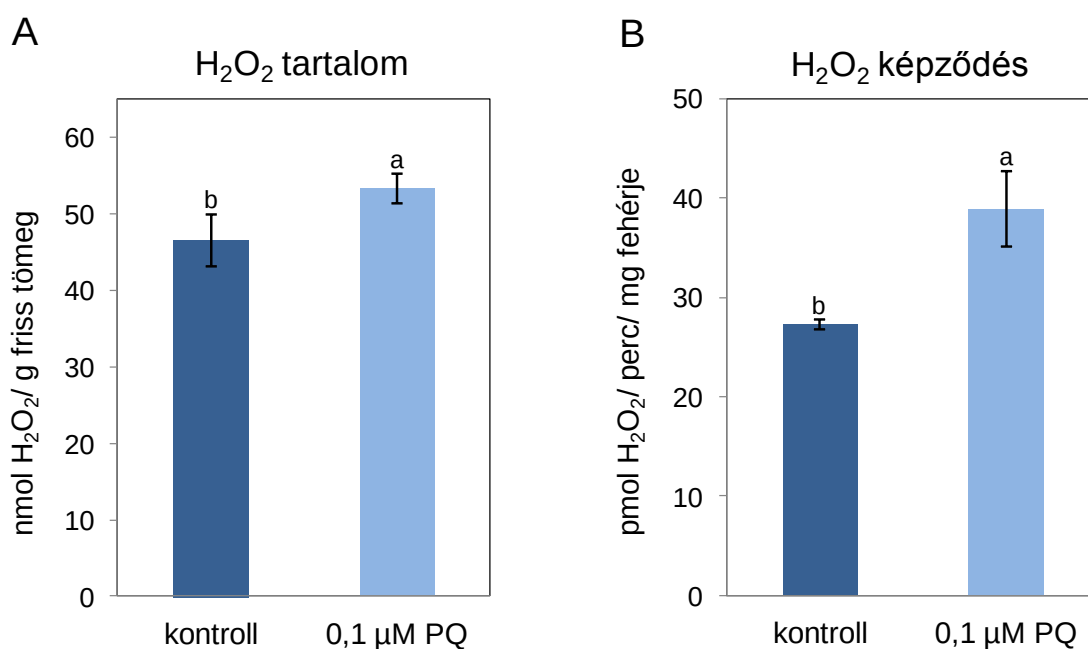
5.1. ábra A szuperoxid dizmutáz aktivitásának mérése

A: A SOD aktivitásának mérése kontroll és 0,1 μ M paraquattal kezelt *Arabidopsis thaliana* sejtszuspenziós kultúrában ($p < 0,05$)

B: A SOD aktivitásának mérése kezeletlen és 0,1 μ M paraquattal kezelt ép mitokondriumban ($p < 0,05$)

5.2. H_2O_2 kimutatása

A sejtek H_2O_2 tartalmát és a mitokondriumon belüli képződését Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-tel végeztük. A mitokondriumok esetében olyan közegben mértük, amely optimális volt a számukra: kálium-foszfát puffer, mannitol, glutamát, szukcinát, almasav, aszkorbinsav hozzáadásával. A mérés előtt a mintákat sötétben tartottuk. Mind teljes sejtben, mind izolált mitokondriumban megnőtt a H_2O_2 tartalom. Az izolált mitokondriumoknál (5.2. B ábra) 42%-kal megnőtt a H_2O_2 képződése a paraquattal kezelt mintákban a kontrollhoz képest, míg a sejtszuspenziós kultúrában ez a különbség kisebb volt (5.2. A ábra), 15%-kal több hidrogén-peroxidot mértünk a 0,1 μ M paraquattal kezelt sejtekben a kezeletlenekhez képest. Eredményeinkből jól látszik, hogy erőteljesebb volt a H_2O_2 képződés az ép mitokondriumban, mint a sejtben. Növekedése azt jelzi, hogy a mitokondriumra a gátlószer egyértelműen hatást gyakorolt, és ott oxidatív stresszt váltott ki. A H_2O_2 szintje befolyásolólag hat az aszkorbát oxidált és redukált formájára.



5.2. ábra H₂O₂ kimutatása

A: H₂O₂ tartalom mérése kontroll és 0,1 μM paraquattal kezelt *Arabidopsis thaliana* sejtekben

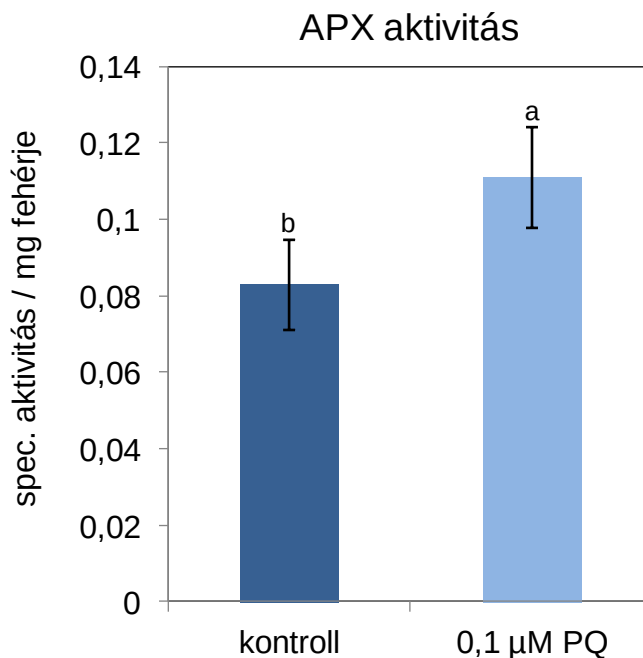
(p < 0,05)

B: H₂O₂ képződés mérése kontroll és 0,1 μM paraquattal kezelt izolált mitokondriumokban (p < 0,05)

5.3. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérése

Az aszkorbát peroxidáznak nagy szerepe van a reaktív oxigén gyökök kioltásában, a növények antioxidáns rendszerének egyik meghatározó eleme, ezért azt is megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a működése az izolált mitokondriumokban paraquat kezelés után. Az APX mérésnél az enzimmennyiséghez adtunk még K-foszfát puffert, aszkorbinsav oldatot, és H₂O₂ oldatot. Időben követtük az APX aktivitását, hogy milyen sebességgel tudja bontani a H₂O₂-t. Az APX specifikus aktivitása is megnövekedett paraquat hatására 34%-kal nagyobb mértékben a kezelt mintákhoz képest (5.3. ábra). Megállapítható, hogy a jelentősen megnövekedett APX aktivitás lehetővé teszi a szintén megnövekedett mennyiségű H₂O₂ redukálását, melyhez aszkorbinsavat használ elektrondonorként. Ezzel egy időben az aszkorbát az APX-en keresztül monodehidroaszkorbáttá (MDHA) oxidálódik. Az MDHA átalakulhat dehidroaszkorbáttá (DHA), vagy visszaredukálódhat aszkorbáttá. A DHA vissza tud alakulni a dehidroaszkorbát reduktáz (DAR) segítségével aszkorbáttá, ami azt eredményezi, hogy a glutationból (GSH) oxidált glutation jön létre.

Legvégül a keletkező GSSG a glutation reduktáz (GR) enzim közreműködésével visszaalakul redukált glutationná NADPH segítségével (Noctor és Foyer, 1998). A GR aktivitását is megvizsgáltuk a továbbiakban.

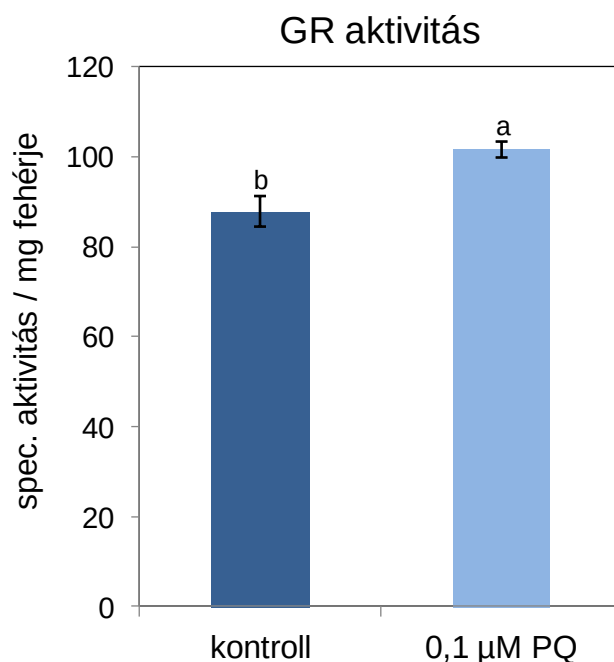


5.3. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérése

APX aktivitás mérése kontroll és 0,1 μM paraquattal kezelt mitokondriumban ($p < 0,05$)

5.4. Glutation reduktáz aktivitás mérése

A glutation meghatározó tényező a sejtek redox állapotának fenntartásában (Láng Ferenc, 2007). Fontos szerepe van a lipidperoxidáció gátlásában a DNS, ill. RNS állomány károsodásának megelőzésében (Zechmann és mtsai., 2006). Szintén részt vesz a H_2O_2 redukálásában az APX és a glutation dehidrogenáz által katalizált reakciókban. A mérés során tionitrobenzoesav keletkezését detektáljuk 5,5-ditiobisz(2-nitrobenzoesav) (DTNB) hozzáadásával. Az aktivitás mérésakor a mitokondriumhoz K-foszfát puffert, NADPH-t, GSSG-t, és DNTB-t adtunk. A GR aktivitása is növekedést mutat a paraquattal kezelt mintákban a kontrollal szemben, tehát képes volt reakcióba lépni a ROS-okkal közvetlenül. Az 5.4. ábrán látható, hogy 16%-kal nagyobb értékek figyelhetők meg a paraquattal kezelt mintákban a kontrollhoz képest.



5.4. ábra: Glutation reduktáz aktivitás mérése

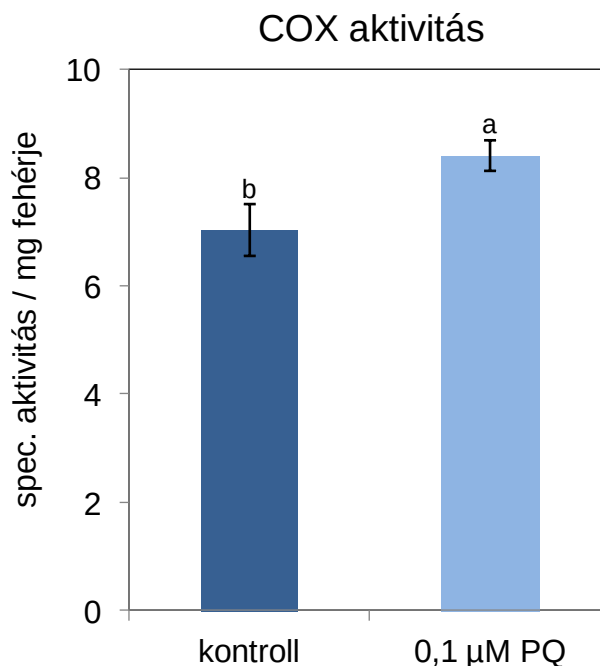
GR aktivitás mérése kontroll és 0,1 μM paraquattal kezelt ép mitokondriumban ($p < 0,005$)

Az eddigi eredményeinkből - SOD, APX, GR enzim aktivitásának fokozódása, H_2O_2 tartalom és képződés megnövekedése - arra következtettünk, hogy a sötétben nevelt sejtszuspenziós kultúrában a paraquat oxidatív stresszt váltott ki, és a keletkező reaktív oxigén gyökök elsődleges forrása a mitokondrium volt. Ezek után azt szeretnénk volna megtudni, milyen változások zajlanak a mitokondriális elektrontranszport lánc komplexeinek működésében, mivel az organelumon belüli ROS képződés elsődleges helyei itt találhatók.

5.5. Citokróm c oxidáz aktivitása

A c típusú citokrómok különféle légzési elektrontranszfer folyamatokat látnak el a sejtek energia-átalakító membránjaiban, részt vesznek bizonyos oxidációs folyamatokban és gázok megkötésében (Tenger Katalin, 2010). A mitokondriális citokrómok olyan hem-fehérjék, melyeknél az elektrontranszport során a hem vas ciklikus $Fe^{2+} - Fe^{3+}$ átalakulása történik. Az oxidált és a redukált citokróm c spektrumaik alapján megkülönböztethetők (Szarka és mtsai., 2004). A citokrómok elektrontranszfer működésének vizsgálatára a mitokondriális légzési lánc IV komplexére jellemző enzimaktivitás mérését, a citokróm c oxidáz (COX) aktivitásmérést végeztünk el. Arra kerestük a választ, hogy gátlódik vagy fokozódik az elektrontranszport láncban a IV komplex működése 0,1 μM paraquat kezeléssel.

hatására. A citokróm c oxidáz aktivitásának mérésekor Na-ditionittal redukáltuk el a citokróm c-t tartalmazó oldatunkat, és a színváltozásból tudtuk mérni az enzimaktivitást. A mérést elvégeztük ép és detergenssel kezelt mitokondriumokkal is, amikor Triton-X-100-at adtunk az oldatunkhoz. Ezzel a méréssel a mitokondriumok épségét vizsgáltuk, ami kísérleteink során kb. 85-90%-os volt. COX aktivitás mérésekor azt tapasztaltuk, hogy 19%-os növekedés volt a paraquattal kezelt mintákban a kontrollhoz képest, tehát a IV komplex aktivitása megemelkedett.



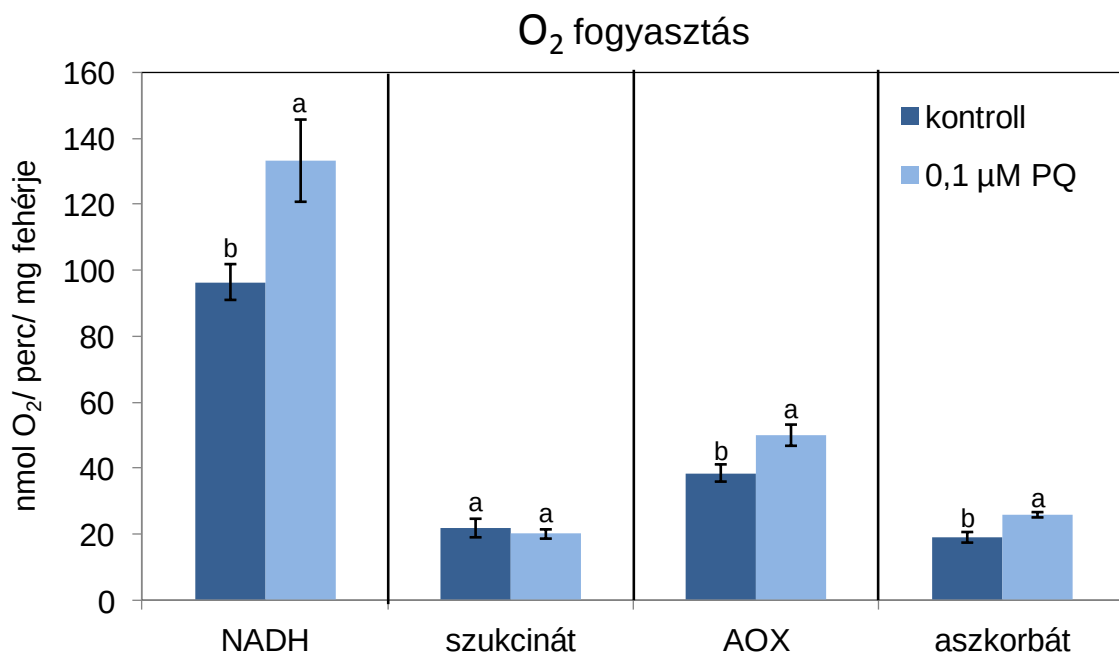
5.5. ábra: A citokróm c oxidáz enzim aktivitásának mérése

COX aktivitás mérése kontroll és 0,1 μM paraquattal kezelt ép mitokondriumban ($p < 0,005$)

5.6. A mitokondriális légzési lánc vizsgálata

A mitokondriális légzési lánc működését más módszerrel is megvizsgáltuk, hogy lássuk, komponensei milyen aktivitással működnek paraquat hatására. A mitokondriális elektrontranszport részt vesz a ROS termelésében különböző biotikus és abiotikus stressz körülmények között (Møller, 2001). Az elektronszállítási láncban az I komplex (NADH dehidrogenáz) és a III komplex (citokróm c reduktáz) a fő helye a ROS képződésnek sötétben és nem zöld szövetekben (Navrot és mtsai., 2007). A lánc komponenseinek vizsgálatakor oxigénfogyasztást mértünk, hozzáadtuk a komplexekhez a szubsztrátjaikat, majd gátlószerekkel leállítottuk működésüket. Az I komplexhez NADH-t adtunk szubsztrátként, majd rotenonnal gátoltuk. A II komplex szubsztrátja a szukcinát volt. A III

komplex oxigén fogyasztását NADH, szukcinát és ADP jelenlétében mértük, gátlószereként antimycin A-t használtunk. A IV komplex szubsztrátja pedig az aszkorbinsav, a gátlószere pedig a kálium-cianid (KCN). A KCN jelenlétében mértük az alternatív oxidázok (AOX) működését is. A növények mitokondriumaiban a ROS képződést jelentősen képesek csökkenteni az oxidatív foszforilációt nem végző légzési utak, amelyek magukba foglalják az alternatív oxidázokat. (Navrot és mtsai., 2007) Az alternatív oxidázokat szalicil-hidroxám savval (SHAM) gátoltuk. A méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az I komplex aktivitása 30-35%-kal megnövekedett paraquat hatására (5.6. ábra). Az alternatív oxidázok aktivitása is növekedést mutatott (25-30%), és a IV komplexben is 30%-os aktivitásnövekedés volt tapasztalható. A II komplex esetében nem tapasztaltunk változást az oxigén fogyasztás mértékében szukcinát hozzáadásakor.



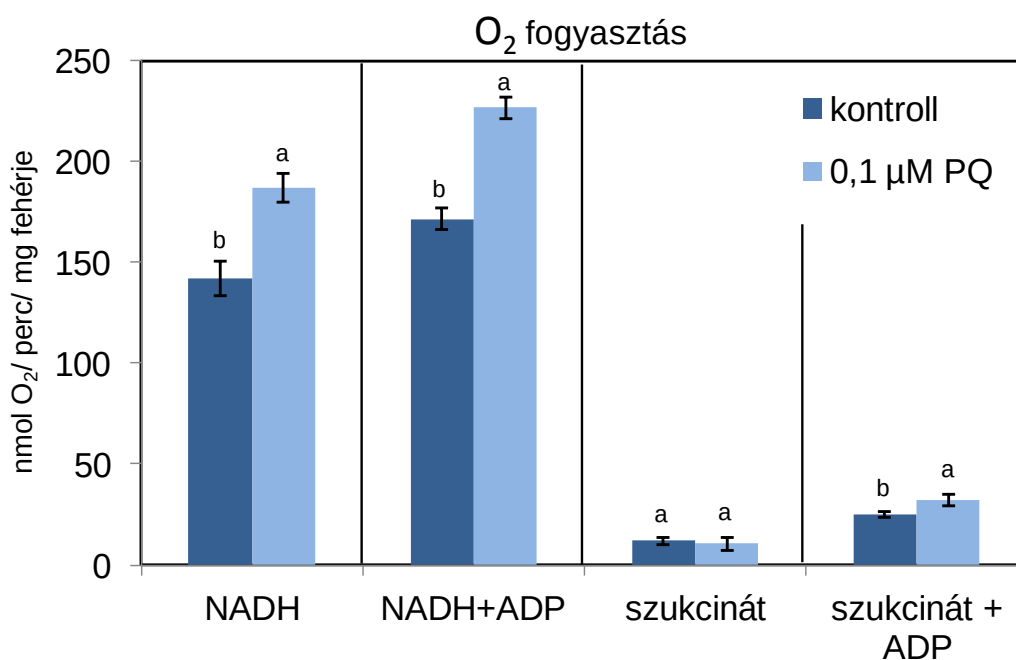
5.6. ábra: Kontroll és 0,1 µM paraquat kezelt sejtszuspenzióból tisztított mitokondriumokon mért O₂ fogyasztás

NADH: I komplex szubsztrátja; szukcinát: II komplex szubsztrátja; AOX: alternatív oxidáz enzim aktivitás; aszkorbát: IV komplex szubsztrátja

Az oxigénfogyasztást ADP jelenlétében, illetve nélküle is megmértük. Az így mért sebességek aránya (O₂ fogyasztás mértéke az idő függvényében) a respirációs kontroll hányados (RC). Az oxidatív foszforiláció sebességét elsősorban az ADP koncentrációja szabja meg. Ha az ATP/ADP arány az ADP javára tolódik el, nő az oxidatív foszforiláció mértéke.

$$RC = \frac{V_{(+ADP)}}{V_{(-ADP)}} > 1$$

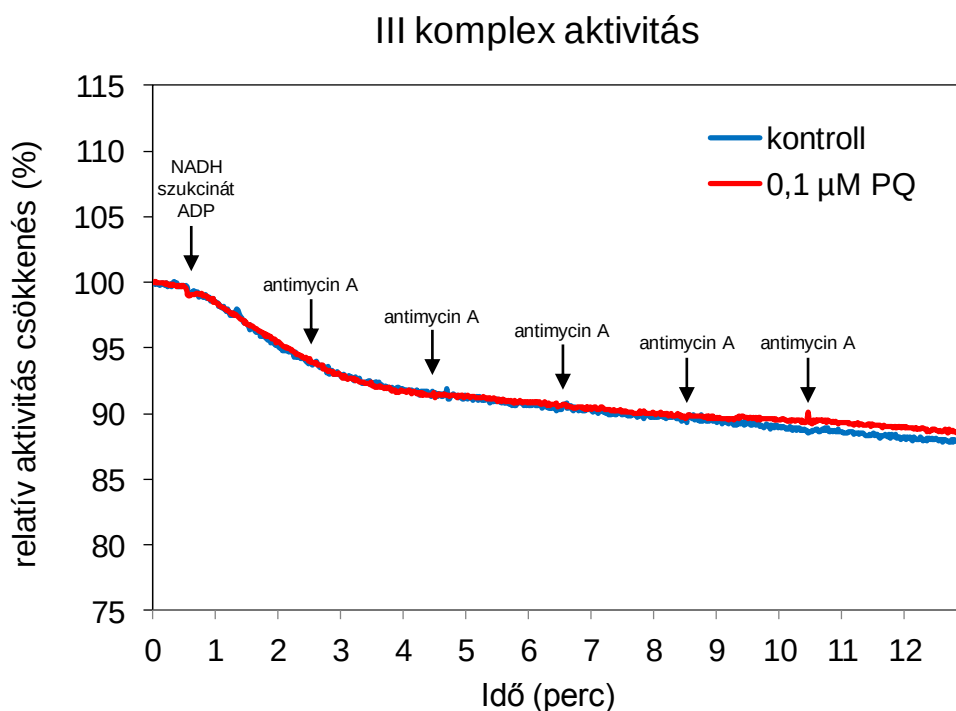
Az ADP-re felhasználódott oxigén mennyiségét egy minta alapján számoltuk ki, melyen az ADP jelenlétében illetve nélküle mért sebességek nyomvonalait meghosszabbítva az így kapott metszéspontok távolságának megfelelő oxigénfogyasztás adta meg a mitokondriumhoz adott ADP-re felhasználódott oxigén mennyiségét. Abban az esetben, mikor a NADH és a szukcinát mellett ADP-t is adtunk a mitokondriumokhoz, szépen látszott a különbség az oxidatív foszforilációban, az aktivitás jelentősen megnőtt az ADP hatására a paraquattal kezelt mintákban a kontrollhoz képest (5.7. ábra). Eredményeinkből kiszámolva az RC hányadost azt tapasztaltuk, hogy míg az I komplex esetében nem találtunk különbséget, addig a II komplexnél 2,5-3-szorosa volt a paraquattal kezelt minták esetében a kontrollhoz képest.



5.7. ábra: Kontroll és 0,1 µM paraquat kezelt sejtszuspenzióból tisztított mitokondriumokon mért O₂ fogyasztás ADP jelenlétében és nélküle

NADH: I komplex szubsztrátja; szukcinát: II komplex szubsztrátja

A III komplex aktivitásának mérésekor az antimycin A gátlószert (NADH, szukcinát és ADP jelenlétében) fokozatosan, kis mennyiségekben adtuk hozzá a mintáinkhoz az 1 μM végkoncentráció eléréséig. A gátlás kialakulásának mértékéből következtettünk a komplex aktivitásának változására paraquat kezelés hatására, és relatív aktivitás csökkenést számoltunk a kontroll minta kiindulási pontjához (100%) képest. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a III komplex működésében (5.8. ábra).



5.8. ábra: A III komplex aktivitásának csökkenése

NADH-t, szukcinátot és ADP-t 0,5 percnél, antimycin A-t 2,5 percnél és azt követően 2 percenként adtunk a kezeletlen és 0,1 μM paraquat kezelt mitokondriumokhoz

A mitokondriális légzési lánc vizsgálataiból levonhatjuk azt a következtetést, hogy az AOX aktivitás növekedése alátámasztotta az eddigi eredményeinket, miszerint a paraquat a mitokondriumokon belül egyértelműen oxidatív stresszt váltott ki az általunk használt koncentrációban sötétben nevelt sejtszuspenziós kultúrán. Mivel az elektrontranszport lánc vizsgált komponenseinek működésében nem tapasztaltunk egyértelmű gátlást, ezért a jövőben további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy megértsük a paraquat működésének pontos mechanizmusát. Ilyen mérések lehetnek többek között a III komplex aktivitásának a mérése ADP nélkül, és ADP hozzáadásával, illetve paraquat közvetlen hozzáadása a mitokondriumokhoz, majd az így bekövetkező változások vizsgálata.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Állati szervezetekben már évtizedek óta tanulmányozzák a paraquat mitokondriumra gyakorolt hatását. Növényeknél is elterjedt körben alkalmazzák oxidatív stressz kiváltására, eddig hatásmechanizmusát leginkább csak a kloroplasztisban tanulmányozták. Dolgozatomban különböző mérési módszerekkel vizsgáltam ezen gátló herbicid hatását sötétben nevelt *Arabidopsis thaliana* teljes növény eredetű sejtszuszenziós kultúrára és az abból izolált mitokondriumokon. Kísérleteinkből kiderült, hogy a paraquat egyértelműen oxidatív stresszt okoz a mitokondriumban. Ezt a többfajta mérési módszer kimutatta. A paraquattal kezelt mintákban a H_2O_2 tartalom egyértelműen megnövekedett, a különbség pedig jobban érzékelhető volt az izolált mitokondriumban, mint a sejtszuszenziós kultúrában. Az antioxidáns védelmi vonal is fokozott működést mutatott a paraquat hatására. A SOD enzim aktivitása megnőtt a sejtekben és a mitokondriumokban, így hatástalanítani tudta a szuperoxid gyököket H_2O_2 képződése mellett. Itt is az izolált mitokondriumban nagyobb különbség volt észlelhető a kontroll és a kezelt minták között. Mivel a SOD a többi antioxidánssal tudja igazán kifejteni hatását, így azokat is megvizsgáltuk. Az APX szintje is megnövekedett az oxidatív stressz hatására a mitokondriumokban, tehát redukálni tudta a H_2O_2 -t, vagyis a reaktív oxigén gyököket sikeresen kioltotta aszkorbinsavat felhasználva elektrondonorként. A GR aktivitása is növekedést mutatott, ami szintén a nagy mennyiségben jelen levő H_2O_2 -dal szembeni védekezési mechanizmus aktiválódására utal. A COX aktivitása is megnövekedett a keletkező reaktív oxigén gyökök hatására az elektrontranszport lánc IV komplexében. Az elektrontranszport lánc komponenseinek az oxigénfogyasztása megnövekedett fokozott működést mutatva, kivéve a III komplexet, ahol nem tapasztaltunk szignifikáns működésbeli különbséget kísérleti rendszerünkben. Ennek okainak pontos megértéséhez további kísérletek szükségesek a jövőben.

7. NYILATKOZAT

Alulírott Képiró Anikó Biológia BSc szakos hallgató kijelentem, hogy a TDK dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel. A dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- sejt kultúra fenntartását,
- mitokondrium izolálást,
- aszkorbát peroxidáz aktivitásmérést,
- glutation reduktáz aktivitásmérést,
- hidrogén-peroxid tartalom és képződés mérését,
- szuperoxid dizmutáz aktivitásmérést,
- citokróm c oxidáz aktivitásmérést,
- mitokondriális légzési vizsgálatot,
- fehérje koncentráció mérést

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012. december 30.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma egyetemi docensnek, az SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, aki lehetővé tette, hogy szakdolgozatomat a tanszéken készíthessem el.

Megköszönöm témavezetőmnek, Dr. Zsigmond Laura tudományos munkatársnak a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségét, valamint dolgozatom elkészítéséhez értékes elméleti és gyakorlati tanácsait.

Köszönöm továbbá Dr. Laskay Gábor egyetemi docensnek, aki lehetővé tette, hogy ebben a témában dolgozhassak.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Ádám Veronika (2004): Orvosi biokémia, Medicina Könyvkiadó Rt.

Arora A, Sairam RK and Srivastava CG (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current science 82: 1227-1238

Babbs C. F., Pham J. A. Coolbaugh R. C. (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. Plants Physiol 90: 1267-1270

Bevan M, Walsh S. (2005) The Arabidopsis genome: a foundation for plant research. Genome Res. 2005 Dec;15(12):1632-42.

Bittsánszky A, Gyulai G, Gullner G, Tóth Z, Kiss J, Szabó Z, Kátai Gy, Heszky L, Kőmíves T (2008) Metilviologen (paraquat) toleráns nyárfaklónok (*Populus x canescens*) szelekciója és alkalmazása a fitoremediációban. Talajvédelem különszám 201-208

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-54.

Cl Encina, M Constantin and J Botella (2001) An Easy and Reliable Method for Establishment and Maintenance of Leaf and Root Cell Cultures of Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology Reporter 19: 245-248

Darvas Béla (2000): A piszkos tizenkettő és felebarátai.4. Istab poharában: a paraquat. Élet és Tudomány, 55: 51-52.

Dhindsa RA, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: correlated with increased permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exp Bot 126: 93–101

Dlaskova A, Špaček T, Škobisova E, Šantorova J, Ježek P (2006) Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1757: 467–473

Dr. Sipos Ildikó (2003): A szabadgyök termelés vizsgálata in situ neuronális eredetű mitokondriumokban

Fujii T, Yokoyama E, Inone K, Sakurai H (1990) The sites of electron donation of photosystem I, to methyl viologen. *Biochem Biophys Acta* 1015: 41-48

Hunyadi K, Almádi L (1981) Szántóföldi gombafajok csíranövényei és herbicidérzékenységük. *Mezőgazdasági Kiadó*, p. 142-144.

Halász K, Soós V, Jóri B, Rácz I, Lásztity D, Szigeti Z (2002) Effect of transporter inhibitors on paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L/ Crong) *Acta Biologica Szegediensis*, 46: 23-24

Ho LHM, Giraud E, Lister R, Thirkettle-Watts D, Low J, Clifton R, Howell KA, Carrie C, Donald T, Whelan J (2007) Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* 143: 1519-1533.

Jimenez A, Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F (1997) Evidence for presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114: 275-284

Ji L. L. and J. Hollander. (2000). Antioxidant defense: Effects of aging and exercise In: *Free Radicals in Exercise and Aging*, Radák Zs. (ed.) Human Kinetics, Chapter 2. pp. 35-72.

Koncz Csaba – Rédei György (1999): A molekuláris genetika eszközei: *Agrobacterium* T-DNS és *Arabidopsis*. In: *Molekuláris növénybiológia*. Szerk. Balázs Ervin – Dudits Dénes. Akadémiai Kiadó. 323-452.

Kruft V, Eubel H, Jänsch L, Werhahn W, Braun HP. (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. Plant Physiol. 2001 Dec;127(4):1694-710.

Láng Ferenc (2007): Növényélettan, A növényi anyagcsere I-II. ELTE Eötvös Kiadó

Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. Plant Physiol 124: 1381-1392

Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant 15:473-497. Pierce, M. and K.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22: 867–880

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 249-279

Novák Béla (1994): Sejtbiológia, Akadémiai Kiadó

Pablo R. Castello, Derek A. Drechsel, and Manisha Patel (2007) Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain 14186-14193

Plaxton WC, Podesta FE (2006) The functional organisation and control of plant respiration. Crit Rev Plant Sci 25: 159–198

Ross J H, Krieger R I (1980) Synthesis and properties of paraquat (methyl viologen) and other herbicidal alkyl homologues, J Agric Food Chem 28: 1026-1031

Szarka A, Horemans N, Banhegyi G, Asard H (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. Arch Biochem Biophys 428: 73-80

Szarka A, Horemans N, Kovacs Z, Grof P, Mayer M, Banhegyi G (2007) Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiol Plant* 129: 225-232

Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* 6: 1-15

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines, *Plant Science*. 151: 59-66.

Zechmann B, Zellnig G and Muller M (2006) Immunocytochemical localization of glutathione precursors in plant cells. *Journal of Electron Microscopy*, 55: 173–181