

## Zárójelentés OTKA NN74045, 2011

### A nemzetközi együttműködés

A pályázat célja alapvetően a vas felvételében és asszimilációjában részt vevő metabolitok és proteinek vizsgálata volt. A spanyol Tudományos Akadémia Aula Dei Kutató Intézetével együttműködésben végzett munkát Mössbauer spektroszkópiával, HPLC-vel, proteomikai és molekuláris biológiai módszerekkel végeztük. Ezek közül a Mössbauer spektroszkópiai és a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz csak a magyar fél laboratóriumában, a HPLC mérésekhez csak a spanyol fél laboratóriumában, a proteomikai vizsgálatokhoz mindkét laboratóriumban rendelkezésre álltak az eszközök. A projekt során elvégzett mérések több témakörben is jelentős tudományos eredményeket hoztak, amelyek egy részét már a szakterületen vezető tudományos folyóiratokban leközöltük, más részét azonban még csupán konferenciákon mutattuk be, ezek közzlése folyamatban van. A két laboratórium komplementaritásán alapuló együttműködés valóban sikeresnek mondható, nemcsak a tudományos eredményeket tekintve, hanem a hazai fiatal kutatók külföldi tapasztalatszerzését, új módszerek elsajátítását tekintve is. Meg kell azonban jegyezni, hogy a spanyol fél a projekt futamideje alatt a tervek részét képező és a kinti laboratóriumban rendelkezésre álló cryo-sectioning módszeren alapuló, a levélrétegekben mérhető gradiensek vizsgálatát a felmerülő problémák (költséges módszer, nagy mennyiségű mintát kell készíteni a további mérésekhez, szennyezés nehezen küszöbölhető ki) miatt végül nem folytatta, hanem a kloroplasztisz vasfelvételével kapcsolatos méréseket és a BN-PAGE segítségével elválasztott tilakoid klorofill-protein komplexek fehérje- és pigment tartalom elemzéseit szorgalmazta. Ennek megfelelően a kooperációs kutatásban az általunk tervezett feladatot sem tudtuk elvégezni, hanem a kloroplasztisz kísérleteket végeztük tovább.

### A vasfelvétel mechanizmusának vizsgálata Mössbauer spektroszkópiával

Megvizsgáltuk a vas kémiai formáit uborka gyökerében a vasfelvétel során Mössbauer spektroszkópiával. A növényeket puffermentes tápoldatban neveltük, vasmentesen, ill.  $^{57}\text{Fe}$ -citráttal ellátva. A vassal ellátott, ill. vashiányos gyökerek  $10\text{--}500\ \mu\text{M}$   $^{57}\text{Fe}$ -citráttal  $30\text{--}180$  percig és  $24$  óráig történő vasellátása után nyert Mössbauer spektrumokat elemeztük. Mértük továbbá a gyökerek vastartalmát és vaskelát redukcióját is.

A vassal ellátott növények gyökerében a Mössbauer paraméterek alapján elkülönítettünk egy nagy spinű  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{A}}$  komponenst oktaédes koordinációban, ami valószínűleg  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -carboxilát komplexektől származik, egy  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{B}}$  komponenst, amit ferrihidritként azonosítottunk és egy szulfát/hidroxid tartalmú  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{C}}$  formát, ami valószínűleg jarozit. Ezekben a gyökerekben nem találtunk kimutatható  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -t. A  $30$  percig  $0,5\ \text{mM}$   $^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ -citráttal ellátott vashiányos gyökerekben  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{A}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{C}}$  és  $48\%$ -ban, hexaaqua komplex formában  $\text{Fe}^{\text{II}}$  komponens volt kimutatható, míg a  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{B}}$  hiányzott. A vasreduktáz aktivitás csökkenése összefüggést mutatott a  $\text{Fe}^{\text{II}}$  és  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{C}}$  komponensek  $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{A}}$ -hoz viszonyított arányában mérhető változással a vasellátás időtartamának függvényében. Az adatok bizonyítják, hogy a vashiányos stratégia I növények gyökerében a vas redukciója gyorsabb, mint a vas felvétele/reoxidációja a citoplazmában.

A vashiányos barack (GF677, *Prunus dulcis* x *P. persica*) leveleiben előforduló vasformákat szintén megvizsgáltuk Mössbauer spektroszkópiával. Egy, ill. két héttel a vashiányos növények vasellátását követően mintákat vettünk a levelekből, majd liofilizáltuk őket a Budapestre történő szállítás céljából (az *in vivo* mérés nem volt lehetséges a levelek alacsony Fe tartalma miatt). A középső levelekből származó mintákban, melyek a legnagyobb koncentrációban tartalmazzák a vasat, egy héttel a kezelés után,  $3$  különböző vasformát elkülönítettünk el. A Mössbauer paraméterek alapján megállapítottuk, hogy a  $\text{Fe}^{\text{III}}$  komponensek karboxilátok és szulfát-hidroxidok, míg a  $\text{Fe}^{\text{II}}$  az uborka gyökértől eltérően nem hexaaqua komplex formában van jelen (a quadrupol felhasadás alacsonyabb). A detektált

vasformák relatív mennyisége: 57% Fe-karboxilát, 31% Fe-OH/SO<sub>4</sub> és 12% FeII. A két hetes mintákban ugyanezeket a vasformákat találtuk, tehát az akkumuláció során nem képződött detektálható mennyiségű új vasvegyület. A levéllemezeket itt már felosztottuk mezofill szövetrészeire és erekre. A mezofillumiban 48% Fe-karboxilát, 43% Fe-OH/SO<sub>4</sub> és 9% FeII volt, míg az erekben 60% Fe-karboxilát, 32% Fe-OH/SO<sub>4</sub> és 8% FeII. A FeIII-karboxilát komponens nagyobb arányú jelenléte az erekben magyarázható azzal, hogy a vas szállítási formája a xilémekben FeIII-citrát. A levélben jelenlévő másik vas-komponens és a FeII kémiai formájának megállapítása az alkalmazott technikával nem lehetséges.

### **Különböző <sup>57</sup>Fe-kelátok Mössbauer spektrumai**

<sup>57</sup>FeEDTA, <sup>57</sup>FeEDDHA (rac+meso), <sup>57</sup>FeEDDHMA (rac+meso), <sup>57</sup>FeDTPA, <sup>57</sup>FeCDTA és <sup>57</sup>FeHEDTA komplexeket készítettünk. A fagyasztott oldatok Mössbauer spektrumai a mintában jelenlévő különböző vas-formákról adnak felvilágosítást. A legtöbb esetben csak Fe<sup>III</sup>-komplexeket találtunk, Fe<sup>II</sup> nem volt jelen. A spektrumok szerint a <sup>57</sup>FeEDTA egyetlen, jól definiálható dimert alkot, aminek a szerkezete valószínűleg  $\mu$ -O-(Fe<sup>III</sup>EDTA)<sub>2</sub>. A <sup>57</sup>FeHEDTA két különböző dimer Fe<sup>III</sup> formából áll. A többi ligandum mind monomer komplexeket képez. <sup>57</sup>FeEDDHA, <sup>57</sup>FeEDDHMA esetében egyetlen fő komponens van jelen, míg a <sup>57</sup>FeCDTA és <sup>57</sup>FeDTPA valószínűleg két különböző monomert alkot.

### **A xilém nedv vizsgálata HPLC-ESI/MS(TOF)-val**

Új módszert dolgoztunk ki a vas-citrát komplexek azonosítására és kvantifikálására oldatokból. Ennek lényege a spanyol fél laboratóriumában működő HPLC integrálása tömegspektrometriával (ESI-TOFMS – electrospray injection time of flight mass spectrometry és ICP-MS – inductively coupled plasma mass spectrometry). A kísérletekben az ESI-TOFMS spektrumokban azonosítható molekuláris Fe-citrát ionokat kerestünk és meghatároztuk a négy stabil vasizotópot, amelyhez <sup>54</sup>Fe és <sup>57</sup>Fe ill. természetes (5,85% <sup>54</sup>Fe, 91,75% <sup>56</sup>Fe, 2,12% <sup>57</sup>Fe és 0,28% <sup>58</sup>Fe) izotópokat használtunk standardként. A Fe-citrát molekuláris ionok azonosításához előbb az elektropray ionizációt optimalizáltuk, majd a HPLC szeparálás körülményeit határoztuk meg.

A módszerrel a standard oldatokban a következő Fe-citrát molekuláris ionokat azonosítottuk: [Fe(III)<sub>3</sub>Cit<sub>3</sub>H]<sup>2-</sup>, [Fe(III)<sub>3</sub>OCit<sub>3</sub>H<sub>3</sub>]<sup>2-</sup>, [Fe(III)<sub>2</sub>Cit<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>, [Fe(III)<sub>2</sub>Cit<sub>2</sub>H]<sup>-</sup>. Megállapítottuk, hogy a különböző ionok létrejötte standard oldatokban a Fe:citrát aránytól függ. Vashiányos, majd Fe-*o,o*EDDHA-val ellátott paradicsomnövények xilémnedvében a [Fe(III)<sub>3</sub>OCit<sub>3</sub>H<sub>3</sub>]<sup>2-</sup> forma volt kizárólagosan azonosítható. A mérések igazolására Mössbauer spektroszkópiával felvettük a <sup>57</sup>Fe: cit = 1:1, 1:50 és 1:100 oldatok spektrumait. A spektrumok alapján azonban a fenti összetételű komplexek kialakulását sem megerősíteni, sem megcáfolni nem tudtuk.

### **Cd-kezelt növények gyökér és levélszövetekre, valamint extraktumokra és nedvekre is kiterjedő Mössbauer analízise**

A vassal ellátott, 10  $\mu$ M Cd tartalmú tápoldatban nőtt uborka növények gyökerében nem volt változás az előforduló vasformákat tekintve a Cd-mentes kontrollhoz képest (főként ferrihidritet és ferri-karboxilát komplexeket lehetett kimutatni).

A 0-100  $\mu$ M Cd-vel 3 órán át előkezelt, majd 30 percig 0,5 mM <sup>57</sup>Fe-citráttal is ellátott -Fe gyökerekben Fe<sup>II</sup> hexaaqua komplexet is kimutattunk. A Fe<sup>II</sup> relatív mennyisége folyamatosan csökkent a Cd koncentráció emelésének függvényében, míg a Fe<sup>III</sup> formák és az összes vas koncentrációja növekedett. Míg 10 és 100  $\mu$ M Cd kezelés mellett a reduktáz aktivitás kisebb volt, mint a vassal ellátott kontroll növényben az Fe<sup>II</sup> kimutatható volt a gyökérben Mössbauer spektroszkópiával, de a vassal ellátott kontrollban ez a forma nem volt mérhető.

A friss levélszövetek és a xilém nedv a Mössbauer spektroszkópia méréshatárához képest nagyon alacsony koncentrációban tartalmaznak vasat. Megállapítottuk, hogy nem lehetséges a vasformákat azonosítani annak ellenére sem, hogy a növényeket  $^{57}\text{Fe}$ -tartalmú tápoldaton neveltük. Ezért liofilizált mintákat készítettünk a kontroll és Cd-kezelt növényekből, kétséges azonban, hogy az így nyert adatok mennyiben tükrözik a vas *in vivo* állapotát. A liofilizált  $^{57}\text{Fe}$  tartalmú szár és levél Mössbauer-spektrumai jelentős eltérést mutatnak a megfelelő vasellátás mellett nevelt uborka gyökér Mössbauer-spektrumától. Mindkét növényi szövetben közel 10 % nagyspinű  $\text{Fe}^{2+}$  vegyület azonosítható, mely paraméterei alapján eltér a korábban a vashiányos gyökérben azonosított  $\text{Fe}^{2+}$ -hexaakva komplextől, de megegyezik a korábban baracklevélben mért komponenssel (ld. fentebb). A liofilizált levél Mössbauer-spektrumában megjelenő másik két komponens közül az egyik jó egyezést mutat az intakt kloroplasztiszok esetén mért komponenssel. Ez utóbbi  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  típusú vas-kén proteineknek, és/vagy hem szerkezeti egységet tartalmazó citokromoknak feleltethető meg (ez tulajdonképpen kisspínű  $\text{Fe}^{2+}$ ). A szár Mössbauer-spektrumában elkülöníthető komponensek és a levél spektrumában fellépő harmadik komponens azonosításához további vizsgálatok szükségesek, mivel ezek Mössbauer-paraméterei eltérnek a növényi szövetekben eddig azonosított vegyületektől.

A gyökérből készített különböző extraktumok mérése során a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -karboxilátok dominálnak a spektrumban.

### **A Fe és Cd felvétel kinetikájának vizsgálata intakt kloroplasztiszokban**

Cukorrépa levelekből izolált kloroplasztiszok vasfelvételét teszteltük. A felvételt követően a kiülepitett, szolubilizált plasztiszok vastartalmát aszkorbinsavas redukció után BPDS-Fe(II) komplex formájában mértük. Vizsgáltuk a plasztiszok vasfelvételi kapacitását Fe(II)-citrát illetve Fe(III)-citrát jelenlétében, sötétben, illetve megvilágítás hatására. Sötétben mind Fe(II)-citrát mind Fe(III)-citrát esetében is csak mérsékelt felvételt tapasztaltunk, míg fényen jelentősen nőtt a Fe(III)-citrát felvétele. A DCMU, mely az amúgy is gyenge Fe(II)-citrát felvételre nem volt hatással, a Fe(III)-citrát felvételét jelentősen gátolta, így annak felvétele DCMU jelenlétében megegyezett a sötétben tapasztalt, illetve a Fe(II)-citrát felvétellel. Ez alátámasztja a kloroplasztisz Fe-felvétel fotoszintézis-függését. Megvizsgáltuk a plasztiszok vasfelvételének Fe(III)-kelát preferenciáját, vizsgálva a felvétel mértékét  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-EDDHA és Fe(III)-nikociánamin jelenlétében.  $\text{FeCl}_3$  és Fe(III)-nikociánamin jelenlétében nagymértékű és nem telíthető vasfelvételt tapasztaltunk, mely abiotikus precipitációra enged következtetni. Fe(III)-citrát és Fe(III)-EDDHA jelenlétében a vasfelvétel telítési kinetikát mutatott, melyek közül mind a nagyobb intenzitású, mind a hamarabb telítődő felvételt Fe(III)-citrát jelenlétében mértük, tehát a plasztiszok Fe(III)-citrát vasforrásból vettek fel könnyebben vasat. Fe:citrát 1:1 komplexek esetében jelentősen magasabb felvételt tapasztaltunk, mint Fe:citrát 1:100 komplexek esetében. A Fe(III)-citrát felvétel kinetikája alapján a vasfelvétel legvalószínűbb sebesség-meghatározó lépésének egy enzim által katalizált reakció, valószínűleg a Fe(III)-citrát redukciója tűnik. Alacsony külső vaskoncentrációnál tendenciózus vas-exportot mértünk, mely egy állandó vas-kicserélődésre enged következtetni a plasztiszok és a citoplazma között. A plasztiszok vasfelvételi kapacitását a plasztiszok belső vaskoncentrációja függvényében vizsgálva a Fe-felvétel egyértelmű telítést mutatott, ami hatékony feedback-regulációjára enged következtetni. Kationok és anionok hatását vizsgálva a monovalens  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$  hatástalannak bizonyult, míg a divalens  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Mn}^{2+}$  serkentette, a  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  és  $\text{BO}_3^{2-}$  pedig gátolta a vasfelvételt. Az eltérő előjelű változások mögött egy membránpotenciálfüggő szabályozás, elméletünk szerint a külső burkolómembrán feszültségfüggő porinjainak nyitódása és zárása állhat. A Cd-kezelt, Zn-kezelt és vashiányos növények izolált kloroplasztiszaiban erőteljesen csökkent a vasfelvételi kapacitás, ahol a hatás erőssége a Cd-kezelés~Zn-kezelés>vashiány fokozati

sorban gyengült. A kezelt növények plasztiszainak vasfelvételi kapacitásai megerősítik a vasfelvétel és a vas beépülésének fotoszintetikus aktivitástól függő modelljét.

Megvizsgáltuk nyárfalevelek kloroplasztiszainak vasfelvételi kapacitását, melyben a cukorrépa plasztiszokkal összevetve semmilyen jelentős eltérést, beleértve a kationok vasfelvételt serkentő hatását, sem találtunk.

Vizsgáltuk továbbá az izolált plasztiszok által felvett vas beépülését Mössbauer spektroszkópiával.  $^{57}\text{Fe(III)}$ -citráton nevelt növények plasztiszaiban 100%-ban  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  clusterekben és/vagy hem koordinációban lokalizált vasat mértünk, míg normál vasforrás mellett nem mértünk jelet mintáinkból. Izolált plasztiszokkal  $^{57}\text{Fe(III)}$ -citrátot felvetve két felvett vasformát tudtuk elkülöníteni: az intakt plasztiszok  $\frac{3}{4}$ -d részben  $\text{Fe(III)}$ -karboxilátokban, míg  $\frac{1}{4}$ -d részben  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  és/vagy hem koordinációban tartalmazták a felvett vasat. A  $\text{Fe(III)}$ -karboxilát komponenst a plasztiszok vasfelvételéhez használt  $\text{Fe(III)}$ -citrátként azonosíthatjuk, ami nagy valószínűséggel a két burkolómembrán között felhalmozódott, míg a maradék vastartalom a plasztiszokba a felvételi idő alatt beépült vas. Kationok hozzáadására nem tapasztaltunk változást a felvett vas megoszlásában, mely megerősíti azt a feltételezésünket, hogy hatásukat a külső burkolómembránon keresztüli vasfelvételre fejtik ki.

Eredményeink alapján felállítottuk és finomítottuk a plasztiszok vasfelvételének modelljét, melyből korábban csak a  $\text{Fe(III)}$ -komplexek fényfüggő felvétele és a belső burkolómembránon történő  $\text{Fe(II)}$ -ion áthaladás, proteinkomponensei közül pedig a belső burkolómembránban lokalizált PIC1 és a bizonytalan lokalizációjú FRO7 volt ismert. A kísérleti eredményeinken alapuló modell szerint a külső burkolómembránon mind  $\text{Fe(II)}$ -, mind  $\text{Fe(III)}$ -kelátok képesek áthaladni, melyek a két burkolómembrán közötti térben halmozódnak fel. Az áthaladásban minden bizonnyal porin jellegű csatornafehérjék vesznek részt, melyek feszültségfüggő nyitódására/záródására vannak hatással a kationok illetve az anionok. A belső burkolómembránon történő áthaladáshoz azonban szükség van a következtetéseink alapján a belső burkolómembránban lokalizált FRO7 működésére, mely a fotoszintetikus elektrontranszportlánc által megtermelt redukálókapacitás terhére  $\text{Fe(III)}$ -kelátokból szabad  $\text{Fe(II)}$ -t szabadít fel. Így minden olyan stresszhatás (Cd, Zn stress, vashiány), amely a fotoszintetikus hatékonyságot csökkenti, negatívan hat a kloroplasztiszok vasfelvételi kapacitására is. A  $\text{Fe(II)}$ -ionok a PIC1 permeáz segítségével képesek áthaladni a belső burkolómembránon. A sztrómába bejutott  $\text{Fe(II)}$  gyorsan és hatékonyan épül be  $\text{Fe}_x\text{S}_x$  komplexekbe és porfirin vegyületekbe, így a sztrómába felvett vas  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  és hem vasként jelenik meg a Mössbauer spektroszkópiás mérésekben. A sztróma vastartalma azonban egy kevésbé ismert mechanizmus révén hatékony feedback-gátlást fejt ki a kloroplasztiszok vasfelvételére.

### **A kloroplasztisz borító membrán proteomikai vizsgálata (BN/SDS PAGE és IEF/SDS 2D PAGE).**

A cukorrépa alkalmasabbnak bizonyult a plasztisz borítómembrán izolálásra, mint a nyár. A kidolgozott módszerrel nagy mennyiségben izolálhatók cukorrépa plasztisz kevert burkolómembránok mind kontroll mind nehézfém-kezelt növényi mintákból. Az izolált külső+belső borítómembrán preparátumot nagy tisztaságban sikerült előállítani a triózP transzlokátor és Lhc antitestekkel végzett Western blotting és SDS PAGE mintázat alapján (<10% tilakoid keresztzennyezés). Az IEF-hoz előkészített borítómembrán preparátumból hosszas munka során sem sikerült eltávolítani az összes pigmentet, valószínűleg többnyire karotinoidokat, emiatt a proteinek rosszul vagy nem fókuszálódtak, így felhagytunk a módszer alkalmazásával. A „Blue-native” (BN)-SDS PAGE 2D módszer megfelelőbbnek tűnik. Sikerült protein komplexeket elválasztani a szolubilizálás optimalizálása után, amelyek közül messze legnagyobb mennyiségben a protein transzlokon komplex figyelhető meg, és amely

vélhetően tartalmazza a belső burkolómembrán feltételezett Fe-transzporterét, a Pic1/Tic21-t. A 2D géleken két PSI és valószínűleg egy PSII sávot, valamint szabad, monomer jellegű LHC-proteineket határoztunk meg, melyek a burkolómembrán eredetű proteinkomplexek vizsgálatát nem befolyásolják. A kis móltömegű komplexek vizsgálatát nagyban nehezíti azonban a TPT, mint a burkolómembránban domináns fehérje abundanciája, amely miatt a szétválasztás különösen ebben a régióban további finomításokra szorul az eredmények közléséhez. A BN-PAGE alkalmasnak tűnik előfrakcionálási módszerként is a transzportereket tartalmazó komplexek feldúsítására a „metal affinity shift assay”-hez. Totál kloroplasztisz fehérjéken végzett metal-shift assay-k biztatónak tűnnek, melyben a második dimenzióban alkalmazott  $Fe^{3+}$  ionok lassították több fehérje mozgását is a poliakrilamid gélben, különösen a 30-40 kDa móltömeg közötti régióban, azonban az eredmények közléséhez további megerősítő vizsgálatra van szükség.

### **A kloroplasztisz fémion transzportereinek mRNS szintjében Fe ellátástól függő, illetve Cd kezelés hatására bekövetkező változások követése qRT-PCR-rel.**

A pályázat elfogadását követően vezető laborokban azonosították a belső burkolómembrán vastranszporterét, illetve a plasztisz burkolómembrán vas-kelát reduktázát, melyek esszenciális feladattal bírnak a vaskelát felvételben, sőt azonosítottak még további két transzportert, melyeknek szintén szerepe lehet a tilakoidok, illetve a burkolómembránok vastranszportjában. Arabidopsisban kimutatták az AtPic1/Tic21 Fe-transzporter esszenciális szerepét, mely szekvenciának a *Populus* EST adatbázisban két rokon ortológ szekvenciáját határoztuk meg, melyek főleg SNP-kben különböznek, de a prediktált proteinek aminosav szekvenciája különböző. Annak tesztelésére, hogy mindkettő expresszálódik-e *Populus*-ban, két primerpárt terveztünk, mindkét illetve csak az egyik cDNS-ének felszaporítására. A primerek alkalmasságát jelenleg még teszteljük. A PCR reakció normalizálása után válik lehetővé mindkét gén expressziójának vizsgáljuk qRT-PCR-rel. *Arabidopsis* növényekben az egyetlen Pic1 szekvencia konstans expressziót mutat, azonban a *Populus* genomban a két expresszálódó szekvencia genomi szintű eltérő regulációra enged következtetni. A vas-kelát reduktáz (AtFro7) *Populus* ortológját(jait) azonban sokkal nehezebb feltárni, hiszen a AtFro7 szekvencia paralógjai is közel rokon szekvenciák, így csak nagy mennyiségű lokalizációs vizsgálattal lenne megállapítható, hogy egy levélben expresszálódó Fro-családba tartozó szekvencia fehérjeterméke valóban a kloroplasztiszban lokalizált-e nyárfában.

### **A Zn és Fe ellátás, valamint a Zn/Cd stressz hatása a fotoszintetikus komplexek összetételére, szerveződésére a különböző tilakoid doménekben.**

Víz kultúrában nevelt kontroll, valamint 4 leveles koruktól Cd-kezelt ( $10 \mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ), Zn-kezelt ( $200 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ), illetve vashiányos nyár (*Populus jaquemontiana* var. *glauca* cv. Kopeczkii) és cukorrépa (*Beta vulgaris* cv. Orbis) növényekből izolált tilakoidokat dodecilmaltoziddal szolubilizáltuk és a komplexeket BN/SDS PAGE-sel vizsgáltuk. A sávok közül, amelyek különböző PSI, PSII és Lhc (szuper)komplexeket tartalmaztak, az azonos mobilitásúak protein összetétele nem különbözött a kontroll és a stresszelt növények esetében. A PSI aggregátumok kevesebb Lhca2,3-t és több Lhca1,4-t tartalmaztak, a PSII oligomerek Lhc tartalmukban különböztek. A kezelések azonban megváltoztatták a sávok egymáshoz viszonyított arányát. Ezek a változások az ellenállóbb nyár és az érzékenyebb cukorrépa esetében különböztek.

Nyár tilakoidokban az akut Cd stressz (9-14 napos kezelés) következtében egy csökkent elektrontranszport aktivitással párhuzamosan megemelkedett a PSII oligomerek, CP43-at nem tartalmazó PSII partikulumok és a monomer Lhc-k, ugyanakkor csökkent a PSI és az LHCII+kapcsoló antenna (CA) komplexek aránya. Bár az NPQ mértéke csökkent feltehetően a lazábban kapcsolódó, könnyebben szolubilizálódó Lhc komplexek miatt, a kioltó

folyamatokban fontos szerepet kapott a nagyobb, inaktív PSII komplexek általi kioltás, ami fontos védő mechanizmus lehet az akut stressz fázisában. A PSI csökkenése elsősorban a Cd indukálta Fe-hiány (40%-nyi Fe halmozódott fel a levelekben) következménye lehet. Hosszabb Cd kezelés (21 nap) után azonban mind a fotoszintetikus aktivitás, mind a kontrollhoz hasonló tilakoidszerkezet helyreállt. Eközben a klorofill (Chl) tartalom alig emelkedett, a Chl *a/b* arány és az NPQ viszont helyreállt, ami új, működőképes reakció centrumokat tartalmazó komplexek kialakulására (reorganizáció) utal. A PSII szerveződésbeli különbségei azonban fennmaradtak, ami a Cd hatására bekövetkezett, akklimatizációs jellegű lipidösszetételbeli változásokkal függhet össze. A hasonló komplexek azonban más-más funkció tölthetnek be akut és krónikus Cd stressz esetében. A vashiány, ami nyárnál a Chl *a/b* arány csökkenését indukálta, elsősorban a PSI arányát csökkentette, míg a CP43 nélküli PSII aránya kissé emelkedett a kontrollhoz viszonyítva, egyébként a PSII szerveződése hasonló volt a kontrolléhoz. A fotoszintetikus aktivitás bár csökkent, ez nem volt olyan jelentős, mint a Cd esetében.

A tilakoid doméneket (a nehéz gránum frakciókat és a könnyű sztróma membránokat) nyárfa tilakoidokból digitoninos szolubilizációval állítottuk elő, és differenciál centrifugálással választottuk el. A Cd-kezelt tilakoidok valamivel nagyobb mértékben szolubilizálódtak és nagyobb mennyiségű anyag jelent meg a könnyű frakcióban, de a felülúszóban megint kevesebb volt az anyag. A szolubilizációs differenciák is a megváltozott lipidszerkezettel lehetnek összefüggésben. A BN/SDS PAGE-sel elválasztott azonos mobilitású sávok proteinösszetétele hasonló volt a tilakoidokéhoz, illetve a kontroll és a kezelt frakciókban, de arányuk jelentősen eltért. A Cd-kezelt és kontroll gránum core membránok Chl *a/b* aránya és pigment-protein összetétele nem különbözött. A PSII oligomerek aránya viszont nagyobb volt, mint a kontroll frakcióban, és ennek szerepe lehetett a Cd kezelt levelekben kimutatható, megemelkedett inaktív PSII általi nem-fotokémiai kioltásban az akut Cd stressz alatt. A Cd-kezelt tilakoidokból nyert könnyű frakciók Chl *a/b* aránya alacsonyabb volt, mint a kontrollé a magasabb, elsősorban monomer Lhc tartalom miatt. A CP43-at nem tartalmazó, regenerálódó/regenerációra váró PSII partikulumok a kontroll növényekben főleg a sztróma lamellákban voltak kimutathatók, míg a Cd-kezelt növényekben a gránumszéli membránokban is nagy mennyiségben jelentek meg.

Cukorrépa tilakoidokban a 21 napos Zn kezelés, bár a Cd stresszhez hasonlóan 20%-ra csökkentette a Chl tartalmat és csökkentette a Chl *a/b* arányt, kevésbé változtatta meg a membránok szerveződését, mint a Cd stressz és a vashiány. Elsősorban a PSII aránya csökkent, szerveződése viszont alig különbözött a kontrollétól. Cd kezelés hatására elsősorban a PSI (alacsonyabb Chl *a/b* arány), vashiány esetében pedig az LHCI aránya csökkent (magasabb Chl *a/b* arány). A PSII szerveződése e stresszek esetében hasonlóan változott: az oligomer és dimer PSII aránya csökkent, a monomerek és CP43-nélküli monomerek aránya pedig megemelkedett. Az azonos mobilitású BN sávok pigment tartalma, hasonlóan a proteinösszetételhez, nem változott a vashiányos és Cd-kezelt növényekben. A VAZ tartalom főleg a PSII kapcsoló antenna sávokban volt kimutatható, és kissé csökkent e kezelések hatására.

A tilakoidmembrán makrokomplexek proteinössztétel-változását az általunk kidolgozott 3D (BN/IEF/SDS) PAGE módszerrel vizsgáltuk kontroll, vashiányos és Cd-kezelt cukorrépa növényekben. A rendszer első eleme a nemionos közegben gyengén szolubilizált tilakoidmembrán-makrokomplexek BN-PAGE elválasztása, majd a makrokomplex-sávokból külön-külön acetonos lecsapással és rehidrációval kinyertük a proteineket, melyeket utána pH 4-7 lineáris pH-gradiens mellett izoelektomos fókuszálással választottunk külön. 3.D-ben az izoelektomos pontjuk alapján szétvárt proteineket tömeg alapján gradiens-SDS-PAGE segítségével különítettük el, majd az irodalomból nem ismert protein-foltokat nano-HPLC-MS segítségével kezdtük meghatározni. Vizsgáltuk emellett a BN-PAGE géleken elválasztott makrokomplexek pigmenttartalmát is HPLC elválasztás segítségével.

Vashiányos tilakoidmintákban 3 fehérjefolt jelenik meg újonnan, egyet aldolázként azonosítottunk. A vashiányos tilakoidokban jelentősen csökkent az LHCII antenna mennyisége és megnőtt az LHC monomerek aránya. Mind vashiányos mind a Cd-kezelt tilakoidokban lecsökkent a PSII-LHCII oligomerek mennyisége. A BN gérendszerből történő pigmentizolálást jelenlegi tudásunk alapján még nem írtak le. A kezelésekre hatására a xantofill-ciklus pigmentjei megjelentek a PSII-LHCII oligomerekben és az LHCII trimerekben.

### **Zn-hiányos és Fe túladagolás mellett nevelt növények gyökerének, leveleinek Mössbauer analízise**

Zn-hiányos és 0,05 mM (5-szörös) <sup>57</sup>Fe-citrát vasellátás mellett neveltünk növényeket. 16 napos növények gyökerét mérve a kapott spektrumokban semmilyen eltérést nem észleltünk a kontroll növényekhez képest. A Mössbauer spektroszkópia alapvetően kvalitatív mérési eljárás, tehát az eredmények arra utalnak, hogy sem a Zn-hiány, sem pedig a vas túladagolás nem befolyásolja szignifikánsan a gyökérben létrejövő vasformákat. A vas többlet mellett vártuk, hogy esetleg valamilyen raktározott forma megjelenését kimutathatjuk, de ez az elképzelés sem igazolódott.

A 0,05 mM vasellátás mellett nevelt növények leveleiben először tudtunk in vivo vasformákat detektálni Mössbauer spektroszkópiával. A spektrumok nem különböznek a korábban kontroll uborka és barack leveleinek liofilizálással szárított mintáinak spektrumaitól. Ezek a mérések a jövőben lehetővé teszik a levelek további vizsgálatát ezzel a technikával, mert valószínűsíthető, hogy a liofilizálás nem befolyásolta a vas állapotát a szövetben.

### **Zöld gél technikával különböző levélrétegekből nyert klorofill-protein mintázatok analízise. A klorofill-protein sávok összetételének tanulmányozása BN/SDS 2D PAGE-sel és tömegspektrometriával.**

A levélrétegekben feltételezett gradiensek analízise nem valósult meg. E mérések teljes egészében a spanyol fél előzetes kísérleteire támaszkodtak. A mérések során számos probléma merült fel, ezért helyettük a spanyol fél kérésére a kloroplasztisz vaskomplexének kinetikájának méréseit terjesztettük ki a 3. évben. A méréseket a spanyol fél által biztosított nicotianamine (10mg = 2000 euró) vaskomplexével is elvégeztük a zaragozai laboratóriumban, valamint elsőként végeztünk Mössbauer spektroszkópiai méréseket intakt kloroplasztiszokkal. Továbbá a kloroplasztisz vaskomplexének kinetikájának méréseit terjesztettük ki és a BN-PAGE segítségével elválasztott klorofill-protein komplexek fehérje- és pigment tartalom elemzéseit végeztük, amely területen jelentős eredményeket értünk el (ld. fentebb).