

D o k t o r i é r t e k e z é s

A fém-ionok és koproporfirin szabályozó szerepe a
tetrapirrol bioszintézisben

Irta:

Gombos Zoltán

MTA Szegedi Biológiai Központ

Növényélettani Intézete

Szeged

1983

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	1
I. Irodalmi áttekintés	3
I.1. Porfirinek, bilin pigmentek szerkezete kémiai és spektroszkópiai tulajdonságai	3
I.2. A klorofill bioszintézis	7
I.3. Fikocianobilin szintézis	15
I.4. A fém-ionok hatása a tetrapirrol alap- vázu természetes pigmentek szintézi- sére	17
II. Anyag és módszer	21
II.1. Alga sejtkultúrák tenyésztése	21
II.2. Vékonyréteg kromatográfia	24
II.3. A Zn-KOPRO és a Zn-URO standardok szintézise	27
II.4. Gélszűrés	28
II.5. Fluoreszcencia mérések	28
II.6. Abszorpciós szinképek felvétele	28
III. Eredmények	29
III.1. A Co^{2+} és Mn^{2+} -ionok által okozott gátlás hatóhelyei és hatásmechanizmu- suk a tetrapirrol bioszintézisben	29
III.2. Fe^{3+} aktiválás	38
III.3. ALS hatására történő KOPRO III kivá- lasztása GGB sejtekben	42
IV. Diskusszió	45
Összefoglalás	52
Köszönetnyilvánítás	54
Irodalomjegyzék	55



RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

PROTO	- protoporfirin
KOPRO	- koproforfirin
URO	- uroporfirin
ALS	- 5-aminó levulinsav
Mg PROTO	- magnézium-protoporfirin
A	- optikai denzitás
D	- dalton
F _{rel}	- relativ fluoreszcencia intenzitás
R _f	- retenciós faktor
GGB	- <i>Cyanidium caldarium</i> klorofill mentes mutánsa
A.nidulans	- <i>Anacystis nidulans</i>
UROGÉN	- Uroporfirinogén
KOPROGÉN	- koproporfironogén
PROTOGÉN	- protoporfirinogén

B E V E Z E T É S

A fotoszintetizáló organizmusok számára nélkülözhetetlen folyamat a fény felvétele és annak kémiai energiává történő átalakítása. Az élő szervezetekben a fényhasznosítás a fény átalakítására specializálódott szervekben történik.

Magasabbrendű növényekben a kloroplasztiszokban történik a fény átalakítása. Az algákban fénybegyűjtő szervként a fikobiliszómák működnek. A kloroplasztiszban és a fikobiliszómában a fényt pigmentek abszorbeálják. Mindkét organellel fényelnyelésében a tetrapirrolo alapvázú pigmentek játszik a legfontosabb szerepet. A növényekben a zárt, porfirin vázas és a nyílt-láncú tetrapirrolok egyaránt megtalálhatók. A porfirin vázas pigmentek legfontosabb képviselői közé tartoznak a klorofillek, citokromok, peroxidázok, katalázok és a hem.) Ez utóbbi vegyület az élővilág legkülönbözőbb egyedeiben is megtalálható. Elsősorban az emlős szervezetek számára nélkülözhetetlenek, mint az oxigén megkötéséért és szállításáért felelős hemoglobin része. A növényekben is találtak már nyílt-láncú tetrapirrolokat, a fitokrom rendszerek kromofor részeként. E rendszerek a növények fejlődésének korai szakaszában játszanak mindmáig kiderítetlen, de nélkülözhetetlenek feltételezett szerepet.

Az algákban a klorofillek szintén megtalálhatók. A növényekhez képest a különbséget a nyílt-láncú tetrapirrolok megnövekedett jelentősége jelenti. A fikobiliszómában a nyílt-láncú tetrapirrolok fehérjéhez kötött változatai találhatók meg és ezek, mint fénybegyűjtő pigmentek működnek.

Az energia hasznosítás fotoszintetizáló organizmusokban lezajló folyamata a kutatások középpontjában áll. A fotoszintézisről igen nagy tudásanyag halmozódott fel napjainkig a fény elnyeléséért felelős pigmentek bioszintézisének vizsgálata a háttérbe szorult és ennek tudható

be az, hogy ismereteink a pigment bioszintézis területéről csak hézagosnak mondhatók. A bioszintézis egyes lépései egyáltalán nem, vagy csak részlegesen tisztázottak. Többek között a hem kialakulásának egyes lépései is ismeretlenek, míg a fikobilinek szintézisének PROTO IX-et követő lépésére, vagy lépéseire csak találgatások vannak, meggyőző kísérleti adatok nélkül. Mindezek tudatában célként tűztük ki a tetrapirrol bioszintézis egyes részfolyamatainak tisztázását, felhasználva a fémionoknak a szintézisre gyakorolt gátló és aktiváló hatásait. A pigment szintézis mechanizmusának megértése a mezőgazdaságban számottevő kárként jelentkező fém toxicitás károk felderítésére és védekezési módok kidolgozására nyújthat lehetőséget. A kísérleti munkák kivitelezéséhez a rendkívül érzékeny fluoreszcencia spektroszkopiát hívtuk segítségül.

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I.1. Porfirinek, bilin pigmentek szerkezete, kémiai és spektroszkópiai tulajdonságai /Falk, 1975/

A porfirinek szerkezetének felderítésére, és kémiai tulajdonságainak meghatározására tett első kísérletek a XX. század első felében történtek meg. Ekkor születtek azok a művek, melyekben a porfirinek és fém-porfirinek szerkezetének és tulajdonságainak átfogó és részletes ismertetését adják. /Wilstätter és Stohl, 1928, Fischer és Orth, 1934, 1937, Fischer és Stern, 1940, Lemberg és Legge, 1949/

Porfirinek

Szerkezet

A porfirin négy pirrol gyűrüből épül fel, melyeket metin hidak kapcsolnak össze. Sik-planáris szerkezetű konjugált rendszer. A makrociklus szerkezetét először Küster /1912/ írta le. A végső, szerkezetet bizonyító kísérletet Fischer és Zeile /1929/ végezte a protohem teljes szintézisével.

Kémiai tulajdonságok

Aromaticitás. A porfirin gyűrűnek 18 delokalizált elektronja van. Ez megfelel a Hückel szabály $4n+2$ / alapján az aromás jelleghez szükséges elektronok számával.

Az aromás jelleget más fizikai-kémiai mérések és számítások is megerősítették /Stern és Klebs, 1930/. A számos elektrofil szubsztitúciós reakció, amit a porfirin váz szubsztituálatlan szénatomjain végeztek, egy-szerre bizonyíték a váz aromás jellege és stabilitása mellett.

Bázicitás. A porfirinekben található két pirrolenin nitrogén atom proton megkötő tulajdonsága. A két NH cso-

port protont képes leadni. Ez okozza a váz amfoter karakterét. A megfelelő pK értékek Phillips dolgozatában találhatók meg /Demsey és m.társai, 1961/. Egyes porfirinek viszonylag erős bázisok, mono-, és dikationos formában egyaránt izolálhatók /Demsey és m.társai, 1961, Grigg és m.társai, 1973/. Erős lúgokban anionos alakban találhatók.

Savszám /Wilstätter és Mieg /1906/. Az a HCl koncentráció /g/ml/ amelynél azonos térfogatú dietiléterből a porfirinek 2/3-a kiextrahálható. A savszám alapján mód van a porfirinek azonosítására, illetve következtetéseket vonhatunk le kémiai tulajdonságaira vonatkozóan.

Komplexbépzés. A porfirinek sajátos szerkezetüknél fogva két értékű kationokkal könnyen képeznek igen stabil komplexeket. Jó kelátorok, e tulajdonságuk erősíti biológiai jelentőségüket.

Stabilitás. A porfirinek hővel szemben viszonylag ellenálló. Magas hőmérsékleten sem bomlanak. Ezt a tulajdonságukat felhasználva alkalmanként szublimálást használnak tisztításukra.

A porfin váz savakkal szemben is ellenálló. Tömény kénsav és trifluor ecetsav a porfin vázat sértetlenül hagyják. Ezek a savak alkalmasak a központi fém atomok eltávolítására a porfirin váz degradációja nélkül.

Fotooxidáció. Fény hatására a porfirinek oldott állapotban oxidációt szenvednek. A vinil oldalláncot tartalmazó, biológiai szempontból nagyon jelentős protoporfirin IX fényen gyorsan fotooxidálódik, fél élet ideje kevesebb mint 30 perc /Fitzpatrick és Deleo, 1977/, fotoprotoporfirin és izoprotoporfirin keletkezése közben /Fischer és Bock, 1938, Barrett és Clesy 1959/. Az URO és KOPRO fél élet ideje több óra /Fitzpatrick és Deleo, 1977/. A porfin vázon lévő erős elektrofil csoportok, mint például a formil csoport, meggátolhatják a vinil csoport oxidációját. /Barrett és Clesy, 1959/



Spektroszkópiai tulajdonságok

Már 1883-ban Soret a hemoglobin abszorpciójában 400 nm-nél egy maximumot figyelt meg, ezt a későbbiekben róla nevezték el "Soret" sávnak Gamgee a többi porfirinnél is kimutatta a 400 nm-es sáv meglétét. Ez a 400 nm-es sáv csak a teljesen konjugált szerkezetű porfin vázra jellemző. Ez a tény lehetőséget biztosít a porfirinek könnyű azonosítására és mennyiségi meghatározásukat is lehetővé teszi.

Savas és lúgos oldatukban, amikor a porfirinek ionos formában vannak jelen, a "Soret" sáv a magasabb hullámhosszok felé tolódik el. Abban az esetben, ha a porfirin egy kationt kelál az abszorpciós spektrumon a "Soret" sáv mellett két másik sáv is megjelenik a látható tartományban. Kb. 510 és 550 körül. A porfirinek egy jelentős része nemcsak elnyelni képes a fényt, hanem fluoreszcens fény formájában ki is képes azt sugározni. A kisugárzott fény magasabb hullámhosszú, kisebb energiájú, mint az elnyelt. Ez a tulajdonságuk teszi alkalmassá a porfirin származékok egy jelentős részét, hogy biológiai rendszerek fény begyűjtő pigment apparátusaként működjenek.

Bilinek

Szerkezet

A bilinek nyílt-láncú tetrapirrolok, melyekben a négy pirrol molekulát egy konjugált rendszer köti össze. Szerkezetük felderítését Lemberg /1928/ végezte el.

Kémiai tulajdonságok

A bilinek tulajdonságai nagymértékben megegyeznek a gyűrűs, porfirin vázat tartalmazó pigmentek tulajdonságaival. A meglévő különbségeket az aromás jelleg megszűnése okozza.

A bilinek amfoter tulajdonságú vegyületek, melyek savakban, lúgokban és szerves oldószerekben egyaránt jól ol-

dódnak, A vázon lévő karboxil csoportok észtereshetők. A pirrolenin és NH csoportjaiban található nitrogén atomjainak tulajdonságai megegyeznek a porfirin molekuláknál leírt hasonló pozícióban lévő nitrogén atomok tulajdonságaival. A két értékű kationokat szintén kelálják.

Spektroszkópiai tulajdonságok

A bilinek cink komplexüket leszámítva nem fluoreszkálnak. Proteinhez kötődve jelentős mértékű fluoreszcenciát mutatnak. Ez teszi őket alkalmassá, hogy fénybegyűjtő funkciót töltsenek be az algasejtekben. A bilin kromofor kovalensen kötődik a proteinhez.

I.2. A klorofill bioszintézis

Az ALS szintézis.

A glicin, szukcinil koenzim A reakció ut.

A tetrapirrol alapvázat tartalmazó természetes pigmentek általános prekursorának az ALS bizonyult. Mint azt az 50-es évek elején elvégzett radiokémiai vizsgálatok segítségével kimutatták, az ALS a glicinnek a szukcinil koenzim A-val való reakciójában keletkezik /Shemin és Kumin, 1952/. Shemin és munkatársai kimutatták a glicin és a szukcinil koenzim A közvetlen szerepét a protohem szintézisben, valamint igazolták az ALS prekursor voltát a porfirinek szintézisében /Shemin és Russel, 1953/.

Az ALS szintéziséért felelős enzimet az ALS-szintetáz Gibsonnak és munkatársainak sikerült csirke vérből izolálni /1958/. Ugyancsak ők mutatták ki a piridoxálfoszfát kofaktor szerepét a glicin és a szukcinil koenzim A kondenzációjában. A kondenzációs reakció valószínűleg a α -amino - β -ketoadipinsavon keresztül megy /Shemin és Russel, 1953/ ennek jelenléte azonban nem volt kimutatható, mivel az nagyon labilis és spontán dekarboxileződést szenvedve rögtön ALS-sé alakul át /Laver, 1959/.

Az ALS szintetáz több, az aldehid csoporttal reagálni képes vegyület, és komplexképző is gátolta /cianid, L-cisztein, stb./. Ezek mindegyike a piridoxálfoszfáttal reagál /Gibson, 1958/.

Semin és Russel /1953/ feltételezték egy, az előzőekben leírt reakciótól eltérő aminoketon szintézis utat. Ezt a későbbiekben megerősítették azok a kísérletek, melyek segítségével kimutatták a glicinnek más acil koezim A-kal történő reakcióját /Urata és Granick, 1963/. Gibson

/1961/ rámutatott annak lehetőségére, hogy ez a kompetíciós reakció, mint a klorofill szintézis egyik reguláló lépése működik. Ez a feltételezés mind ez ideig nem nyert megerősítést.

Az ALS szintetáz izoelektromos pontját 5.9-nek találták. pH optimuma 7.0 és 7.8 között változik a kísérleti objektumtól függően. Molekula tömege 50-600 ezer dalton.

Warnick és Burnham /1971/ az általuk izolált ALS szintetázt vas/III/cianiddal, ditiotreitollal és merkaptóetanollal aktiválhatónak találták.

Az ALS szintetáz legjelentősebb inhibitora a hem. Porra és Irving /1972/ közvetlenül kimutatták a hemin gátló szerepét. Feltételezésük szerint az enzim a hem vas atomjával egy koordinációs kötést alkot és az így keletkezett komplex már nem képes enzim aktivitást kifejteni. A hem gátló hatása a tetrapirrol szintézis regulációjának egyik lehetséges módja. Az ezzel kapcsolatos, napjainkban megjelent nagy számú cikk ellenére a reguláció, a gátlás mechanizmusa tisztázatlan /Kitchin és Farmer, 1981, Beale és Foley, 1982, Warnick és Burnham /1971/.

ALS transzamináz.

Az ALS szintézis egy másik lehetséges utja az β -ketoglutarát transzaminálása. A reakciót az ALS transzamináz enzim katalizálja /Gibson és munkatársai, 1961, Gassman és munkatársai, 1968/. Chlorella sejtekben mutattak ki ALS transzamináz aktivitást. Beale és Castelfranco /1974/ zöld levelekben mutatták ki az enzim jelenlétét.

Az ALS szintézis két alternatív utja egymás mellett és egymást kiegészítve létezik /Beale és Foley, 1982, Meller és Gassman, 1982/.

Pirrol szintézis, a porfobilinogén kialakulása.

A porfobilinogén a szintézis ut első, nitrogén heteroatomot tartalmazó gyűrűs köztiterméke. A molekula jelenlétét biológiai rendszerekben Westall /1952/ mutatta ki.

A vegyület karakterizálását Cookson és Rimington /1953/, valamint Granick és Bogorad /1953/ végezték el. Ezzel egy időben igazolták azt, hogy a porfobilinogén a porfirin szintézis intermediere.

A porfobilinogén két ALS molekula kondenzációja során keletkezik. A kondenzációt az ALS dehidratáz katalizálja. Az enzimet Granick /1954/ és Schmid és Shemin /1955/ izolálta.

Az ALS dehidratáz aktivitása függ a szulfhidril csoportokat tartalmazó vegyületek jelenlététől. A kálium-ionok is aktiválják az enzimet /Burnham és Lascelles, 1963/. Mindkét aktiváló hatást az enzim aggregációs fokának megnöveléseként fogták fel /Nandi és Shemin, 1968, van Heyningen, 1971/. Az ALS dehidratáz heminnel /Burnham és Lascelles, 1963/ és PROTO-val /Nandi és munkatársai 1968/ egyaránt gátolható.

Bár a fém-ionok aktiváló hatását csak a kálium esetében mutatták ki, azt egyértelműen bebizonyították, hogy fém-ion kelátorok gátolják az enzimaktivitást.

Az ALS dehidratáz jelenlétét, könnyű kimutathatósága ellenére eddig csak néhány növényben sikerült bizonyítani. Shetty és Miller /1969/ dohánylevélből izolálták az enzimet. Az enzim pH optimuma 7.4 volt. Ez az érték alacsonyabb, mint a fotoszintetizáló baktériumokból izolált enzimnél kapott érték.

Az EDTA gátolta az enzimet, a kálium-ionok aktiváló hatását nem lehetett kimutatni. A vas/II-ionok gátlókként hatottak az enzimre. Az ALS dehidratáz aktivitása a növény fejlődési állapotától függ. Az aktivitás nő a levelek és szövetkultúrák zöldülése során /Steer és Gibbs, 1969, Stobart és Thomas, 1968/.

Az enzim-reakció első lépéseként valószínűleg egy Schiff bázis keletkezik az enzim aktiv oldalán, majd ezt követi a tényleges kondenzáció.

A porfobilinogén szintézis legtöbbet tanulmányozott gátlója a levulénsav, mely vegyület kompetitív gátlást okoz. Az ALS-hez hasonlóan képes Schiff bázist kialakítani az enzimmel, meggátolva ezzel az ALS kapcsolódását. Az enzim így nemcsak az ALS-ek közötti kondenzációt katalizálja, hanem az



ALS, levulénsav közöttit is. Az így kapott kondenzációs termék nem tud porfirinné tovább alakulni. Növényekben Beale és Castelfranco mutatták ki a levulénsav gátló hatását /1971, 1974/. Kék-zöld algák esetében is hatásos gátlónak bizonyult a levulénsav /Kipe-Nolt és Stevens, 1979/.

A tetrapirrol váz kialakulása, az uroporfirinogén szintézis.

A gyűrűs tetrapirrolok közül a porfirinekhez vezető szintézis út során először az UROGÉN szintetizálódik meg. A vegyület négy pirrol gyűrűből áll, melyek mindegyikén egy propionsav és egy ecetsav oldallánc van. A több lehetséges izomer közül az UROGÉN I ill. III fordul elő biológiai rendszerekben. Az UROGÉN III-at először Bogorad és Granick /1953, Bogorad, 1955/ mutatták ki Chlorella sejtekből, később vörös vérsejtekből is izolálták /Mauzera11 és Granick, 1958/. Az UROGÉN I négy porfibilinogén molekula fej-láb illeszkedésű kondenzációja során képződik. Chlorellából /zöld alga/ izoláltak egy olyan enzim frakciót, amely a porfibilinogén tovább alakulását katalizálta. A reakció termékek között URO III, URO I és PROTO IX jelenlétét azonosították. Az UROGÉN-URO átalakulás autofotooxidációs lehetőségét már korábban kimutatták, ezért valószínűsítették azt, hogy a porfibilinogénből keletkezett UROGÉN egy része átalakult URO-vá, míg a másik része PROTO IX-cé alakult át. Ha ezt az enzim frakciót 50⁰C-ra melegítették a porfibilinogén átalakulása zavartalanul folyt tovább, de az előző kísérlethől eltérően végtermékként csak URO I-et találtak /Bogorad és Granick, 1953/. Ezek a megfigyelések vezettek arra a felismerésre, hogy az UROGÉN I szintéziséért felelős enzim hőstabil, az UROGÉN III szintetáz pedig hőérzékeny enzim.

Az UROGÉN I szintetázt Bogorad /1958a/ izolálta először spenótból. UROGÉN I szintetáz mentes UROGÉN III kon-szintetázt is ő izolált először/1958b/. Az UROGÉN I szintetázt a formaldehid, a p-kloromerkuribenzoát, az ezüst és higany-ionok inaktiválják. A porfobilinogén analógok kompetíciós gátlást fejtenek ki /pl. az izoporfobilinogén/.

UROGÉN dekarboxileződése, KOPROGÉN szintézis

A KOPROGÉN négy karboxil csoportot tartalmazó tetrapirrol, ami az UROGÉN dekarboxileződése során keletkezik. Ezt az átalakulást az UROGÉN dekarboxiláz enzim katalizálja. Az UROGÉN ecetsav oldalláncai átalakulnak metil csoportokká, miközben az UROGÉN izomerből a megfelelő KOPROGÉN izomer keletkezik.

Az ötvenes évek elején erősödött meg az a nézet, ami szerint az UROGÉN III-at és a KOPROGÉN III-at nem csak kémiai szerkezete rokonítja a PROTO IX-cel, hanem annak prekursorai is a klorofillhez vezető bioszintézis uton.

Wittenberg és Shemin /1949, 1950/ a protohem degradációs analízisével kimutatták a tetrapirrol vázon lévő metil csoportok közös eredetét és azt, hogy a vinil csoportok a propionsav dekarboxileződésével keletkeznek. További kísérletek során tisztázódott az UROGÉN prekursor szerepe a KOPROGÉN szintézisben. Igazolták, hogy KOPROGÉN III-ból képződik a PROTO IX, nem pedig a KOPRO III-ból, mint azt korábban többen feltételezték /Bogorad, 1955, Neve és munkatársai 1956, Mauzerall és Granick, 1958/.

A KOPROGÉN III oxidatív dekarboxileződése, PROTOGÉN IX szintézise.

A KOPROGÉN III propionsav oldalláncai oxidatív dekarboxileződés során vinil csoportokká alakulnak, ez egyuttal a KOPROGÉN III PROTOGÉN-né való átalakulását is jelenti. Ezt a reakciót a koprogenáz enzim katalizálja.

Sano és Granick /1961/ kimutatták, hogy az enzim a KOPROGÉN izomerek közül kizárólag a KOPROGÉN III-at tekintti szubsztrátjának, és csak azt képes PROTOGÉN IX-cé átalakítani. A koprogenázról sokáig azt feltételezték, hogy oxigént igénylő enzim. Ehteshamuddin /1968/ olyan enzim frakciót izolált, amely anaerob és aerob körülmények között egyaránt képes a KOPROGÉN, PROTOGÉN átalakulást katalizálni.

Fémkelátorokkal az anaerob körülmények között hatásos enzimet gátolni lehetett és az aerob körülmények között katalizálót nem. Ez a megfigyelés kétféle, egymástól függetlenül működő enzim jelenlétére utal. A magnézium-ionok, az ATP és a metionin nélkülözhetetlenek az enzim számára. Hatásuk azonban még ismeretlen.

A koprogenázt a fémkelátorok inaktiválják. Az o-fenantrolin és az EDTA már 1 mM koncentrációban meggátolta az enzim aktivitást. A dohánylevelekből izolált koprogenázt a vas/II/-ionok széles koncentráció tartományban aktiválják. A Mn^{2+} -ionok és a Co^{2+} -ionok alacsony koncentrációban aktiválták az enzimet. /Hsu és Miller, 1970/

A PROTO IX szintézise.

A PROTOGÉN, PROTO átalakulás egy oxidációs reakció eredménye, melynek során kialakul a konjugált kötési rendszer, a porfirin gyűrű. Egyelőre még tisztázatlan az a kérdés, hogy ez a reakció enzim-katalizált-e, vagy autooxidációs reakció eredményeként megy végbe /Jacobs és munkatársai 1982/.

Az oxidációs reakció termékeként kapott PROTO IX a pigment bioszintézis lánc elágazási pontja. Itt válik ketté a bi-linekhez és a klorofillhoz vezető szintézis út.

Fém-ionok kelálása.

A fém porfirinek biológiai jelentőségére viszonylag már korán felfigyeltek. A fém-ionok kelálására csak a porfirin

vázsal rendelkező vegyületek, vagy a belőlük oxidatív hatásra keletkező bilinek képesek. A PROTOGÉN a fém-ionok kelálására nem képes.

A fém-porfirinek a tetrapirrol bioszintézis intermedierjei. A nyílt láncu tetrapirrolok szintézise a vasporfirinen, hemen keresztül megy. A klorofill szintézisben a hemen kívül a Mg-PROTO és észtere is szerepet kap. Más fém-porfirinek is ismert vegyületek, de ezeknek funkcionális jelentőségük még kevésbé ismert.

A hem szintézise.

A vas-PROTO, a hem a legtöbbet tanulmányozott fémporfirin. A vas kelációját katalizáló enzimet a vas/II/-kelatázt Labbe és munkatársai izolálták /1959/ elsőnek. Kimutatták, hogy az enzim a vas- és kobaltporfirin képződést katalizálja, de sem a vas/III/, sem pedig az ón/II/-ionok komplexképződését nem segíti elő. A vas-URO és a vas-KOPRO, illetve más fém-URO és KOPRO kialakulását nem katalizálta az enzim.

Jones és Jones /1970/ egy oldható vas/II/-kelatázt izoláltak, ami a Fe^{2+} -ionok mellett a Co^{2+} - és Zn^{2+} -ionok komplexképződését is katalizálta. Növényekből is izoláltak vas/II/-kelatázt, spenótból /Jones, 1967/, és bablevélből /Goldin és Little, 1969/. A bablevélből izolált enzim a Fe^{2+} - és a Zn^{2+} -ionok kelálódását egyaránt katalizálta.

A Zn-kelatázt is izolálták már /Neuberger és Tait, 1964/. Kimutatták, hogy a Zn^{2+} -ionok kelálódását a Fe^{2+} -ionok gátolják, a fordított irányú gátlást is kimutatták /Maneshin, 1974, Camadro és Labbe, 1982/.

A vas/II/-kelatázt az N-metil és dimetil protoporfirin emlős és növényi rendszerekben gátolták. Növényekben és algákban a gátlással egyidejűleg Mg PROTO felhalmozódást mutattak ki /Brown, 1982, Haughton, 1982, De Matties, 1980/.

Mg PROTO szintézis.

A vas- és cink-porfirin kelatázok egyike sem katalizálja a magnézium-ionok kelálódását /Gorchein, 1972, Fuesler és munkatársai, 1981, Richter, M.L. és Rienits, K.G., 1982/.

Gorchein/1972/ szerint a komplexképződést egy enzimkomplex katalizálja, amely a kelálódást és a metilálást egyszerre katalizálja. A két reakció kapcsolt jellegét több adat is cáfolja /Granick, 1948/.

Mg PROTO észterek szintézise. Mg PROTO metil transzferáz.

Granick /1948/ Ghlorella mutánsokban PROTO, Mg PROTO és Mg PROTO észterek jelenlétét tudta kimutatni. Az észteresítés első lépéseként a C gyűrű propionsav oldallánca észtereződik. A metil csoportokat az S-adenozil metionin szolgáltatja a reakcióhoz /Hinghigeri és Richard, 1982/.

Mg PROTO monometil észtert követő szintézis ut.

A Mg PROTO monometil észtert követő lépést Spiller és munkatársai /1982/, és Chereskin és Castelfranco /1982/ vas függő enzimatisus lépésnek találták. Vas hiány esetén Mg PROTO monometil észter felhalmozódást figyeltek meg.

Mivel dolgozatom tárgya a klorofillhez vezető szintézis ut Mg PROTO monometil észtert követő lépéseit nem érinti, így azokat csak vázlatosan mutatom be.

A Mg PROTO-ból a III. és IV. gyűrűt összekötő metin hid részvételével mindedig még tisztázatlan oxidációs lépés során kialakul az ötödik, karbociklusos gyűrű. Az így létrejött vegyület neve protoklorofillid. A következő lépés a IV. gyűrű fotoredukciója, mely reakció fehérjéhez kötve meggyégbe és a klorofillid kialakulásához vezet. A klorofill molekulaszervezete kialakulásának zárólépése a IV. gyűrű propionsav oldalláncának észteresítése fitollal /20-szénatomos alkohol/.

I.3. A fikocianobilin szintézise.

A fikocianobilin egy nyílt-láncu tetrapirrol vázat tartalmazó kromofor. Proteinhez kapcsolódva alkotja a fikobili-proteint.

Szerkezetét tekintve a fikocianobilin közeli rokonságot mutat az emlős rendszerekben található epefestékekkel. Az epefestékekről ismert volt, hogy azok a hem oxidatív felhasadását követően a vas-ionok elvesztésével keletkeznek. Ennek analógiájára feltételezték, hogy a bilin szintézis is, a hemen keresztül, hasonló reakciók során történik /Bogorad és Troxler, 1967, O hEocha, 1968/.

Az oxidációs reakció eredményeként a porfirin váz a metin hidak mellett nyílnak fel. Az emlős sejtekben kizárólagosan csak az 7. helyzetű metin-hid oxidálódik /Dochery I.C. és munkatársai 1982/. Szénmonoxid keletkezése mellett kialakul a nyílt-láncu tetrapirrol. Az oxidációt az emlősöknél a mikroszomális hem oxigenáz katalizálja /Tenhunen R. és munkatársai, 1968/. Ezt az enzimet mind ez ideig sem növényekben sem pedig alga sejtekben nem találták még meg.

Troxler és munkatársai /Troxler, 1970, 1972, Troxler és Dokos, 1973/ vörös és kék-zöld algák esetén kimutattak szén-monoxid fejlődést. A szén-monoxid felszabadulás sztöchiometriailag is megegyezett a keletkezett fikocianobilinek mennyiségével.

Porfirin vázat tartalmazó vegyületeket például a hemet az alga sejtek nem, vagy csak kis mértékben tudják felvenni. Ezért azok a radioaktív jelöléses kísérletek, amelyek arra irányultak, hogy közvetlenül bizonyítsák a hem prekursor szerepét a fikobilinek szintézisében kudarcot vallottak, vagy ellentmondó eredményekhez vezettek /Godnev, 1966, O'Carra, 1970/. A jelölt hemet az alga sejtek csak afiziológiás körülmények között veszik fel /Brown és munkatársai, 1981/.

A jelölésnek csak mintegy 20 %-a jelent meg a fikobilinokban. A jelöletlen hem alga sejtekhez történt adagolása a fikobilinok mennyiségét nem növelte.

Troxler és Lester /1967, 1968/ a bilinek jelölését ALS segítségével végezték el. Az ALS a bilin kromoforba és a protein részbe egyaránt beépült. Ezek a kísérletek is megerősítették azt a korábbi nézetet, hogy a bilinek és a porfirinek egyazon szintézis út különböző állomásai.

A hem fikobilin szintézisben betöltött szerepét alga és növényi rendszerekben mind ez ideig nem tisztázták, így az emlős rendszerekben talált bilin szintézis uttól eltérő szintézis-mechanizmus nem zárható ki. Csatorday és munkatársai felvetik a Zn PROTO prekursor szerepének lehetőségét /1981/.

A bilinek az élő rendszerekben a klorofillekhez hasonlóan protein komplexeik formájában fordulnak elő. Ez a tény tovább bonyolítja a bilinek szintéziséről kialakított meglehetősen zavaros képet. Máig sem eldöntött az a kérdés, hogy a porfirinek a proteinhez kötve alakulnak-e át fikobilinné, vagy az oxidációs lépés megelőzi a proteinhez való kötődést.

Troxler és Bogorad /1966/ cyanidium caldarium mutánsokból szabad, proteinhez nem kötött bilineket mutattak ki. Ez az adat a proteintől független szintézis utat látszik alátámasztani.

A fikobilin szintézis út sok homályos eleme ellenére az kétségkívül bizonyítást nyert, hogy a porfirin és a bilin szintézis út egyazon szintézis út két szakasza.

I.4. A fém-ionok hatása a tetrapirrol alapvázu természetes pigmentek szintézisére.

Az egyes fém-ionok a pigment szintézis enzimeire gyakorolt hatását az előző fejezetben ismerttettem. A fém-ionok jelentős szerepet töltenek be a növények anyagcsere folyamatainak szabályozásában. A fém-ion hiány és túladagolás egyaránt nagy károkat okoz a mezőgazdaságban. Az okozott növényi megbetegedések egyik formája a klorózis. A klorózis a pigment szintézisben bekövetkezett zavarokat jelzi. Már régóta foglalkoztatja a kutatókat a fém-ionok okozta növényi betegségek biokémiai hátterének felderítése. Hewitt és Nicholas /1963/ összefoglalójukban egységes magyarázatot próbálnak adni a fém-ionok klorofill szintézisre gyakorolt hatására. Bemutatják a vas hiány okozta klorózisról korábban megjelent elméleteket.

Az indukált vas hiányt olyan változó vegyértékű kationok okozhatják, mely ionok negatívabb redoxpotenciálja képes a pigmentszintézis számára hasznosítható vas/II/-ionokat vas/III/-ionokká oxidálni. Ez az elmélet több fém-ion esetében kielégítő magyarázatot szolgáltatott az általuk okozott tünetekre. A legismertebb, vas hiányt okozó fém-ionok közül a mangán szerepét hangsúlyozták ki a szerzők.

Az elmélet általános érvényét több adat is megkérdőjelezi. Ezek közül első helyen kell említeni azt a tényt, hogy a fém-ionok redoxpotenciálja alapján várható gátlás mértéke sok esetben nem egyezett meg a valóságos gátlás nagyságával. Az elmélet hiányosságára mutat rá az a tény is, hogy állandó vegyértékű fém-ionoknál is mutattak ki gátló hatást. A cink és kadmium-ionokról ismert a klorofill szintézisre gyakorolt gátló hatásuk.

Ezeknek az elmentmondásoknak a feloldására született az az elmélet, mely szerint a fém-ionok hatását elsősorban azok komplexképződési tulajdonsága, hajlama határozza meg.



A problémát a komplexképződés összetettsége jelenti. A komplexképződési állandóra hatással van az ion oxidációs állapota, különböző sztérikus faktorok, a kelátor tulajdonságai.

A fém-ionok hatásának egységes értelmezését tovább nehezíti az is, hogy az előbbieken ismertetett tényezőkön kívül további faktorokkal is kell számolni. Ilyen tényezők a növény kora, a táptalajban és a növényben jelenlévő egyéb ionok koncentrációja. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a fém-ionok bonyolult, komplex hatást fejtenek ki a pigment bioszintézisre. A hatás mind ez ideig csak részben ismert.

A vas-ionok hatása a tetrapirrol bioszintézisre.

A vas-ionok az élő organizmusok anyagcsere folyamataiban jelentős szerepet játszanak. Jelentősége vegyértékváltozásra való képességén, valamint kelát-komplex képzési hajlamán alapszik.

A vas-porfirint tartalmazó hem és citokromok a légzési folyamato és a fotoszintézis fontos alkotó elemei.

Vas-ionok hiányában különböző hiány-betegségek lépnek fel. Emlős sejtekben kimutatták, hogy a vas hiány gátolta a mitokondriális hem szintetázt és a mikroszomális hemoxigenáz aktivitását /Liem és munkatársai, 1979/. Növények és állatok esetében is kimutatható volt, hogy a vas hiány a porfirinek szintéziséért felelős enzimeket inaktiválja /Padmanaban és mtsai, 1967/.

De Ciano és mtsai /1979/ vas-hiányos és ele-
gendő vasat tartalmazó táptalajon nevelt szójabab növények klorofill tartalmát hasonlították össze. A vas-hiányos környezetben felnőtt növények klorofill tartalma alacsonyabb volt, mint a rendes körülmények között nevelt növényeké.

Vas-hiány következtében a Mg PROTO és a Mg PROTO mono-metil észter növényekben felhalmozódik /Spiller és mtsai, 1982/.

Stephan és Machold /1968, Machold és Stephan, 1969/, is úgy találták, hogy a vas hiány klorofill szint csökkenést okoz. Ennek okaként a porfirinek szintézisében bekövetkezett gátlást jelölték meg. A KOPRO-val bezárólag felhalmozódtak a porfirin szintézis köztitermékei. E kísérleti adat alapján a KOPRO-genázt egy vas-függő enzimnek valószínűsítették.

Az enzim vasfüggését támasztják alá Hsu és Muller /1970/ dohánylevélből izolált KOPRO-genáz karakterizálása során nyert adatai is.

Öquist /1971/ a vas-hiány *Anacystis nidulans*-ra gyakorolt hatását vizsgálta. Megállapította, hogy az alga sejtek in vivo abszorpciós spektrumában a magasabb hullámhossznál elnyelő klorofill formák aránya csökkent, az alacsonyabb hullámhossznál elnyelő klorofillekhez képest.

A vas-ionok a szokásosnál magasabb koncentrációban egy bizonyos koncentráció határig növelték a klorofill szintet /Rosen és mtsai, 1978/, azt meghaladva klorotikus tüneteket okoztak. A klorózist vas indukálta mangán hiánynak tekintették /Bergmann, 1979/.

A mangán-ionok hatása a tetrapirrol bioszintézisre.

A mangán toxicitás.

A mangán-ionok a növények anyagcseréjének oxidációs és redukciós szabályozásában vesznek részt.

Hiányában klorotikus tünetek jelennek meg a növény levelein. A mangán-hiány a növények klorofill kivonatának alacsony hőmérsékleten felvett fluoreszcencia spektrumában növeli a kisebb hullámhossznál elnyelő klorofill formák arányát /Rozonova és mtsai, 1978/.

A mangán tuladagolása miatt fellépő növényi megbetegedés már régóta ismert. A jelenséget mangán toxicitásnak nevezték el. A toxicitás tünetei: a fiatal leveleken megjelenő klorózis, az öregebb leveleken barnás elszíneződést figyeltek meg /Bergmann, 1979/.

A mangán toxicitás mind a mai napig jelentős károkat okozott és okoz a mezőgazdaság számára. A mangán-ionok gátlóhelyének felderítésére tett széleskörű kutatómunka ellenére a gátlóhely ismeretlen és a toxicitás okának mibenlétére egy-egy magyarázat nem áll rendelkezésre. Hewitt és Nicholas /1963/ indukált vas-hiányként kezelik a toxicitást, de meggyőző bizonyíték nem állt a rendelkezésükre.

Morghan és Freeman /1978/ megállapították, hogy a vas felvétel a jelenlévő mangán-ionok koncentrációjától függ. A mangán gátolja a vas-ionok felvételét és ez fordítva is igaz. Vas komplexek adagolásával a mangán toxicitás tünetei megszüntethetők. Morghan és Rabowicz /1979/ vas/III/ etiléndiamin di/O-hidroxi fenil/acetát komplex segítségével hatásosan ki tudta védeni a toxikus hatást. A vas-ionok aránya a növényekben nőtt, a mangán szint csökkent.

A kobalt-ionok gátló hatása a tetrapirrol bioszintézisre.

A kobalt többlet a vas és a mangán-ionok hiánya esetén jelentkező klorózishoz hasonló tüneteket okoz. Feltételezhető, hogy a kobalt, erős kelátképző hajlama miatt, képes más létfontosságú fém-ionokat kiszorítani az anyagcsere utakban betöltött pozíciójukból /Bergmann, 1979/.

A kobalt-ionok gátolják a tetrapirrol szintézist. Hewitt és Nicholas /1963/ a gátlást a mangán-ionok okozta gátlással azonos természetűnek tartották. A gátlás helyét a klorofill szintézis vas-függő enzimeinél gondolták. Ezt a feltételezést a későbbi kísérleti adatok nem erősítették meg.

R. spheroidesben a kobalt-ionok gátolták a vas porfirinek ALS-ből történő szintézisét /Lascelles, 1956/. Guzelian és Bissel /1976/ kimutatták, hogy patkány májsejtekben a kobalt-ionok gátolják a hem és a P450 apoproteinjének összekapcsolódását.

II. ANYAG ÉS MÓDSZER

II.1. Alga sejt kultúrák tenyésztése

II.1.1. Anacystis nidulans /IU 625/

A sejtek Kratz és Myers /1955/ Medium C-jelű tápoldatával dúsított agaron nevelkedett 3000 lux megvilágítás mellett 20 °C-on. A tápoldat összetétele a következő volt:

	g/1000 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{Ca/NO}_3/2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,025
KNO_3	1,0
Na-citrát $2\text{H}_2\text{O}$	0,165
$\text{Fe}_2/\text{SO}_4/3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,004
K_2HPO_4	1,0
Mikroelemek A5	1 ml

A5	g/1000 ml
H_3BO_3 H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,391
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079

A Co^{++} ionok hatásának vizsgálatakor a mikroelem oldat 0,49/1000 ml $\text{Co/NO}_3/2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott.

Gyorsan növekedő sejt kultúrák előállításához a sejteket az agarról steril körülmények között lemostuk, Medium C-ben szuszpendáltuk 38 °C-on, 10000 lux megvilágítás mellett a levegő és CO_2 95:5 arányú keverékével

buborékolattuk egy 1,5 l ürtartalmú 7 cm átmérőjű üvegcsőben.

Lassan növekedő sejt kultúrák előállításához a sejteket agarról lemosva vagy gyorsan növekedő kultúrából kihigitva $/10^5 - 10^6$ sejt/ml/, 1 cm belső átmérőjű Kimax csőbe helyezve 3000 lux megvilágítás mellett 25°C -on neveltük tovább. A csöveket steril vattával zártuk le.

II.1.2. Cyanidium caldarium

A sejteket sötétben Allen /1959/ tápoldatban Troxler és Bogorad /1966/ szerint módosítva és 1 % szőlőcukorral kiegészítve neveltük. Az így kapott tápoldat összetétele a következő volt:

	g/1000 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,14702
KH_2PO_4	0,272
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2465
H_2SO_4 /1000 ml-re 1,4 ml cc H_2SO_4 /	10 ml
NH_4Cl	0,5349
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,019
Na_2 EDTA	0,0266
Mikroelemek	3 ml
D-glükóz	10 g
Mikroelemek	g/1000 ml
$\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$	0,028
ZnCl_2	0,034
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{Co}/\text{NO}_3/2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,016

	g/1000 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,58
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1,42
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,024

A tápoldat pH értékét pH 3,2-re állítottuk be. Fényen történő továbbnevelésnél a sejteket centrifugálás, majd kétszeri mosás után cukor nélküli friss tápoldatban szuszpendáltuk.

Fluoreszcencia szinképek felvételéhez a sejteket 1 cm belső átmérőjű Kimax csövekben neveltük steril körülmények között. Ily módon lehetségessé vált a sejt-kultúra fluoreszcencia szinképének gyakori felvételére. A sejtek koncentrációja alacsony volt, $/10^5 - 10^6/$ sejt/ml/ így fluoreszcencia reabszorpció nem jelentkezett. Erről higitási sorozat készítésével győződünk meg.

A kromatográfiával kapcsolatos vizsgálatok elvégzéséhez a sejteket 1,5 literes üvegedényekben neveltük. Felhasználás előtt kellő mértékű higitás után meggyőződünk arról, hogy spektrális tulajdonságok szempontjából azonos az idő függvényében felveendő szinképekhez használt híg kultúrákkal.

II.2. Vékonyréteg kromatográfia

II.2.1. Az A. nidulans sejtek feltárása és a porfirinek kinyerése

A sejteket kétszeri, bidesztillált vízzel történt mosás és 3000 g mellett 10 percig tartó centrifugálás után aceton: H_2O :0,1 M NH_4OH /9:2:1/ arányú keverékében /5 ml/ szuszpendáltunk és ultrahang segítségével feltártuk. A porfirineket a Rebeiz és mtsai /1975/ által leírtak szerint extraháltuk, azaz a feltárt sejteket 39000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót azonos térfogatú hexánnal, majd ezt követően 1/3-nyi térfogatú hexánnal extraháltuk. Az acetonos frakciókat peroxid-mentes dietil éterbe ráztuk át 1/17 térfogatnyi telített NaCl és 1/30 térfogatnyi 0,2 M KH_2PO_4 hozzáadása után. Az éteres extraktumokat összegyűjtve, sötétben nitrogén befúvás közben, vákum segítségével koncentráltuk.

II.2.2. Az A. nidulans sejtek által kiválasztott KOPRO kinyerése

A koproporfirin az alga szuszpenzió 3000 g-vel történő centrifugálása után a felülúszóban található. A felülúszóból egyszerű éteres kivonással nem nyerhető ki teljes mennyiségben. Az extrahálást az etil acetátos módszerrel /Furhop és Smith, 1975/ végeztük. A vizes szuszpenzió pH értékét 3,2-re állítottuk be tömény sósavval és ezt követte az etil acetáttal történő többszöri extrahálás. A kivonást mindaddig folytattuk, amíg a vizes fázisban a koproporfirinre jellemző fluoreszcencia még észlelhető volt. Az etil acetátos fázist a kromatográfiát megelőzően nitrogén atmoszféra alatt bepároltuk.



II.2.3. A GGB sejtek feltárása és a porfirinek kinyerése.

A tápoldatba kiválasztott porfirinek izolálása.

A sejtek PROTO és Zn-PROTO tartalmát az *A. nidulans*-nál leírt módon nyertük ki.

Az acetonos közegben kivált protein-KOPRO komplexet a következő módon izoláltuk: A protein kötött KOPRO-t pH2-n savas hidrolízisnek vetettük alá, majd a savas közegből a KOPRO-t ciklohexanonnal extraháltuk ki /Furhop és Smith, 1975/.

A ciklohexanonos fázisból a porfirint 5 %-os HCl oldatba vittük át. A hig savas oldatot bepároltuk. A bepárlás termékeként kapott KOPRO-t etilacetátba oldottuk, és az így nyert mintát használtuk a vékonyréteg kromatográfiás vizsgálathoz.

A sejtek által kiválasztott porfirineket szintén a ciklohexanonos extrakcióval izoláltuk. A kinyert porfirineket etilacetátba vettük fel. Az azonosításuk a sejt-ből izolált porfirinekkel együtt vékonyréteg kromatográfia segítségével történt.

II.2.4. Az *A. nidulans*ből izolált porfirinek vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata.

A Mg-PROTO, Zn-PROTO és PROTO vékonyréteg kromatográfia segítségével történő elválasztása a Rebeiz és Castelfrancó /1971/ által leírtak szerint történt szilika gél H vékonyrétegen /Merck/. A futtató közeg benzol:etil, acetát:etanol /8:8:2/ arányú keveréke volt. A porfirineket a megfelelő standardokkal /Porphyrin products/ való összehasonlítás révén azonosítottuk.

Az UV fényvel történt megvilágítás hatására vörös fluoreszcenciával rendelkező foltokat 2 ml-nyi metil alkohol:aceton /4:1/ arányú keverékéhez adtuk a lapról tör-

tént lekaparás után. Centrifugálás után a felülúszót használtuk a spektroszkópiai meghatározásokhoz.

II.2.5. A GGB sejtekből és a tápoldatból izolált porfirinek vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata.

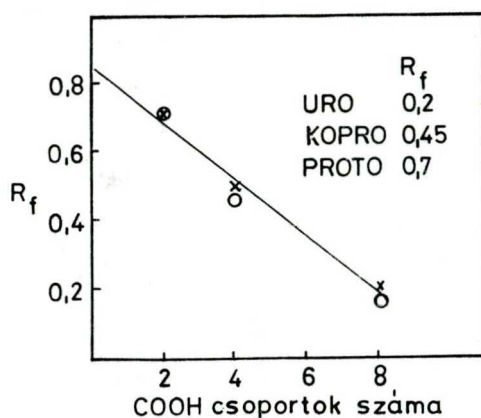
A pigmenteket cellulóz lapon választottuk el /20x20 cm, Merck/. Troxler és Bogorad /1966/ által használt futtató közeg a következő volt:

2,6-lutidin:1.08N ammónia: viz:1M EDTA /25:10.5:7:0.05/.

A módosított közeg 2,4-lutidint és az általuk előírt EDTA mennyiségének négyszeresét tartalmazta, mivel az előző szolvens a Zn porfirinek képződését még nem gátolta meg.

II.2.6. A KOPRO és URO kromatográfiás azonosítása.

A ciklohexanonos kivonást követően a mintát KOPRO, URO és PROTO standardok /Porphyrin products/ mellett vékonyrétegen futtattuk. Futtató közegként 2,4-lutidin: H_2O : 1 M NH_4OH 2:1:0.02 arányú keverékét használtuk, és a futtatást Merck cellulóz vékonyréteg kromatográfiás lapokon végeztük. Falk/1961./ nyomán a szabad porfirinek R_f értékei és karboxil csoportjaik száma közötti lineáris összefüggés segítségével azonosítottuk. /1. ábra/

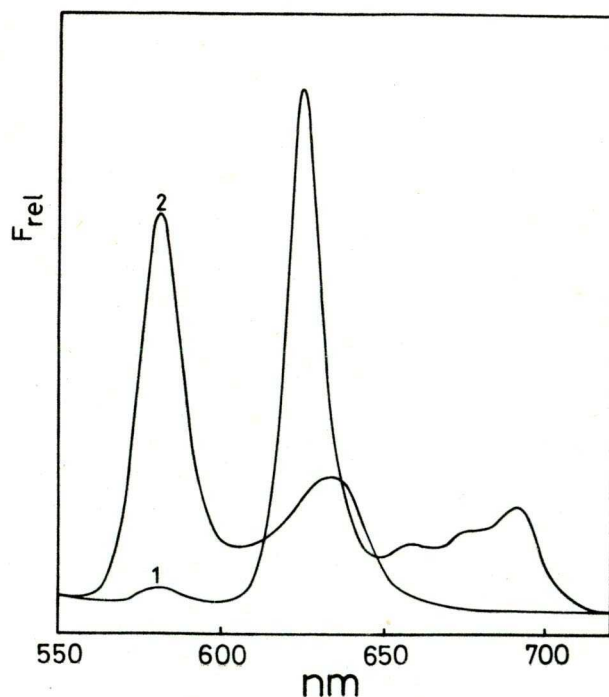


1. ábra. A porfirin standardok /x/ és az izolált porfirinek /o/

R_f értékeit a karboxil csoportok számának függvényében ábrázolva.

II.3. A Zn-KOPRO és a Zn-URO standardok szintézise.

Az URO és KOPRO standardokból etanolos oldatot készítettünk /1mg/ml/. 1 ml etanolos oldathoz 2 ml 1 M $ZnCl_2$ oldatot adtunk. Sósavval a pH-t úgy állítottuk be, hogy a $ZnCl_2$ maradéktalanul feloldódjon. Mivel a túlzottan savas pH a Zn kelálást megakadályozza, ezért az elegy pH-ját 0.1N NaOH-dal pH 5 körüli értékre állítottuk. Az átalakulás megtörténtét fluoriméterrel ellenőriztük /az 585, ill. 580 nm-es sávok megjelenése jelezte, hogy a Zn URO-vá és a Zn KOPRO-vá történő átalakulás lejátszódott/. A KOPRO és a Zn-KOPRO fluoreszcencia spektrumait a második ábra mutatja be.



2. ábra. A KOPRO /1.spektrum/ és a Zn-KOPRO /2.spektrum/ fluoreszcencia spektruma. Gerjesztési hullámhossz: 405 nm.

II.4. Gélszűrés

Az acetonban kicsapódott fehérje frakciót 50 mM Tris HCl /pH 7.5/ pufferbe vettük fel. A fehérjét Sephadex G 25-ös oszlopra rétegeztük. Az oszlopot a 50 mM Tris HCl pufferrel mostuk. A kapott frakciók fehérje tartalmát 280 nm-es abszorpciójuk alapján detektáltuk. A fehérje-KOPRO komplexet fluoreszcenciája alapján határoztuk meg.

Az oszlopot molekulasúly markerekkel kalibráltuk. Markerként inzulint, glukagont és oxitocint használtunk.

II.5. Fluoreszcencia mérések

Fluoreszcencia és fluoreszcencia gerjesztési szinképek felvételéhez Perkin Elmer típusu /MPF-3, ill. MPF-44A/ spektrofluorimétert használtunk. A gerjesztő és megfigyelő oldalon a rések félérték sáv szélessége egyaránt 6 nm volt. A szinképek felvételénél a gerjesztés irányára merőleges megfigyelést alkalmaztunk. A kromatográfiás elválasztás során nyert tetrapirrol származékok fluoreszcencia szinképeit 1 cm-es kvarc-küvettában vettük fel.

II.6. Abszorpciós szinképek felvétele

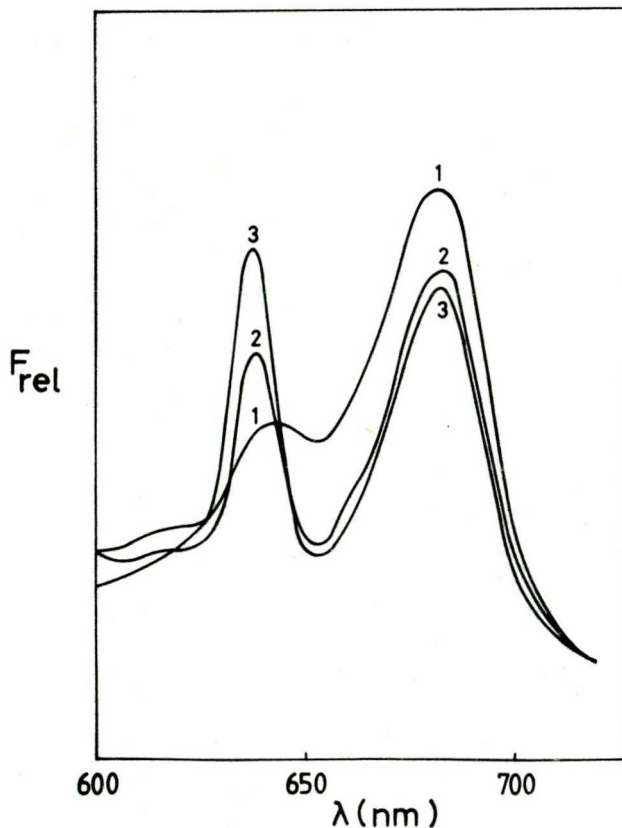
Az abszorpciós szinképeket Unicam SP 1800-as, Perkin Elmer 320-as, ill. Cary 18-as spektrofotométeren vettük fel. A méréseket 1 cm-es rétegvastagság mellett kvarcküvettában végeztük, az Unicam SP 1800-as készülék esetében a közeli mérőhelyzetben. Alga szuszpenziók esetében a Shibata és mtsai /1954/ által bevezetett "opál üveg" módszert alkalmaztuk a fényszórás kiküszöbölésére.

III. EREDMÉNYEK

III.1. A Co^{2+} és Mn^{2+} -ionok által okozott gátlás hatóhelyei és hatásmechanizmusuk a tetrapirrol bioszintézisben.

Co^{2+} gátlás

Nitrát éhezített *Anacystis nidulans* sejtek tápoldatához $\text{Co/NO}_3/2$ -ot adagolva az alga szuszpenzió fluoreszcencia spektrumában 410 nm-es gerjesztésnél 636 nm-nél egy olyan emissziós sáv jelenik meg, mely sávot a kobalt nélküli médiumban regeneráltatott alga sejtek spektruma nem tartalmazza. A kobalt-ionok koncentrációját növelve a 636 nm-es sáv relatív fluoreszcencia intenzitása nőtt /3. ábra/.

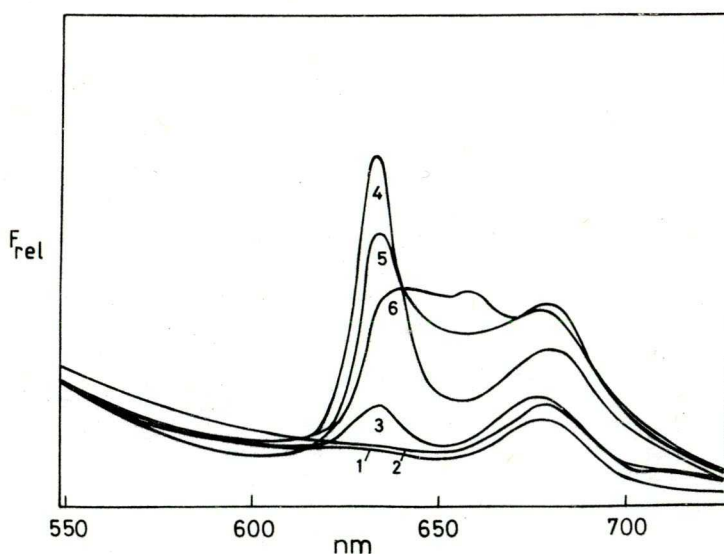


3. ábra. *Anacystis nidulans* regenerálódó sejtek szuszpenzió-

jának fluoreszcencia spektruma különböző Co^{2+} -ion koncentrációk esetén, a komplett tápoldatba történt visszahelyezést követő 24. órában. Az 1, 2, 3, növekvő Co^{2+} -ion koncentrációt jelöl. Az ábrán szereplő 1, 2, 3 számozás 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 5×10^{-6} M $\text{Co}/\text{NO}_3/2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ koncentrációnak felel meg. A gerjesztési hullámhossz 410 nm volt.

A 636 nm-es sávhoz rendelhető porfirint vékonyréteg kromatográfiás azonosítás, és spektrális tulajdonságai alapján PROTO IX-nek azonosítottuk. A PROTO IX felhalmozódás együtt járt a klorofill és fikobiliproteinek szintézisének gátlásával.

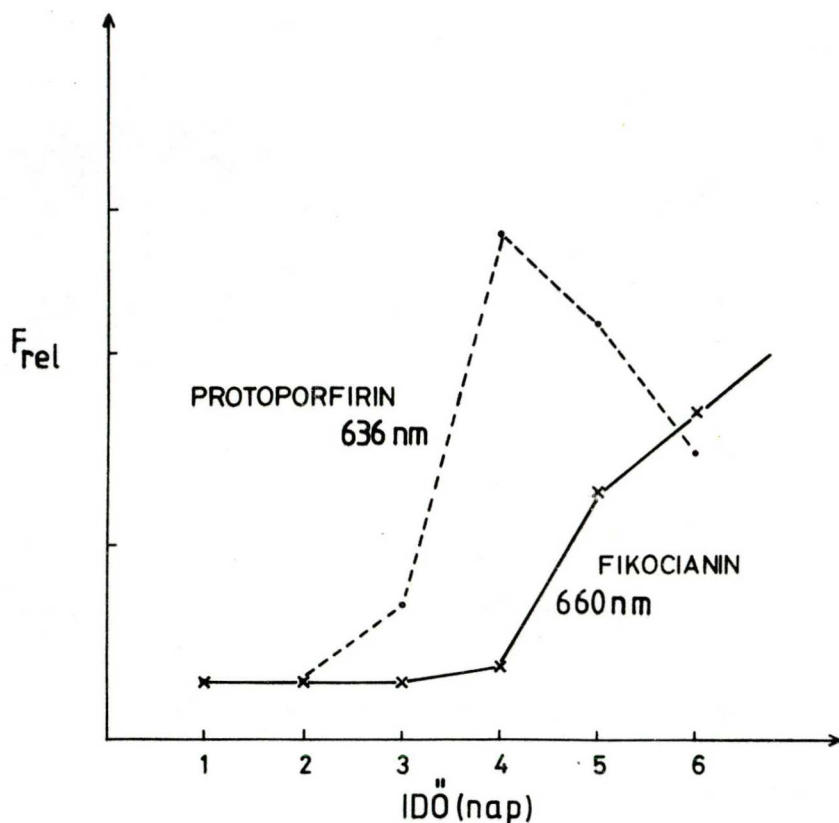
$1,7 \times 10^{-6}$ M $\text{Co}/\text{NO}_3/2$ koncentráció mellett a pigment szintézis gátoltsága csak részleges volt, a PROTO IX tovább alakulhatott klorofillé és fikocianinná. /4. ábra/.



4. ábra. *A. nidulans* sejtszuszpenziójának fluoreszcencia szinképei hat egymást követő napon. A tápoldat $1,7 \times 10^{-6}$ M $\text{Co}/\text{NO}_3/2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott. A fluoreszcencia gerjesztési hullámhossza 396 nm volt, hogy a 636 nm-es

PROTO IX sáv mellett egyidejűleg a fikocianin és allofikocianin is megfigyelhető legyen.

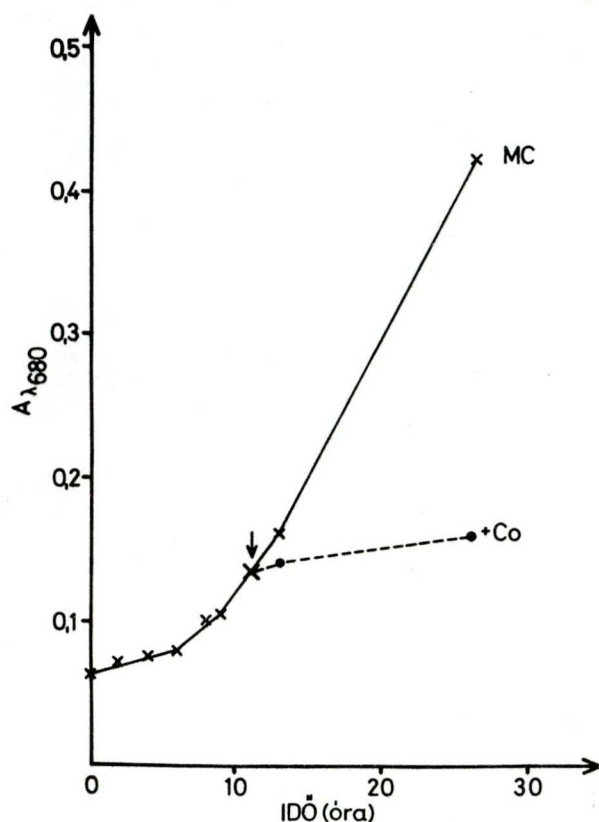
A 4. ábra alapján ábrázoltuk a PROTO IX /636 nm-es sáv/ és a fikocianin /660 nm-es sáv/ relatív fluoreszcencia intenzitásának időbeni változását /5. ábra/.



5. ábra. A 4. ábra fluoreszcencia spektrumaiban a 636 nm-es /PROTO IX/ és a 660 nm-es /fikocianin/ sávok relatív fluoreszcencia intenzitásainak időbeni változása.

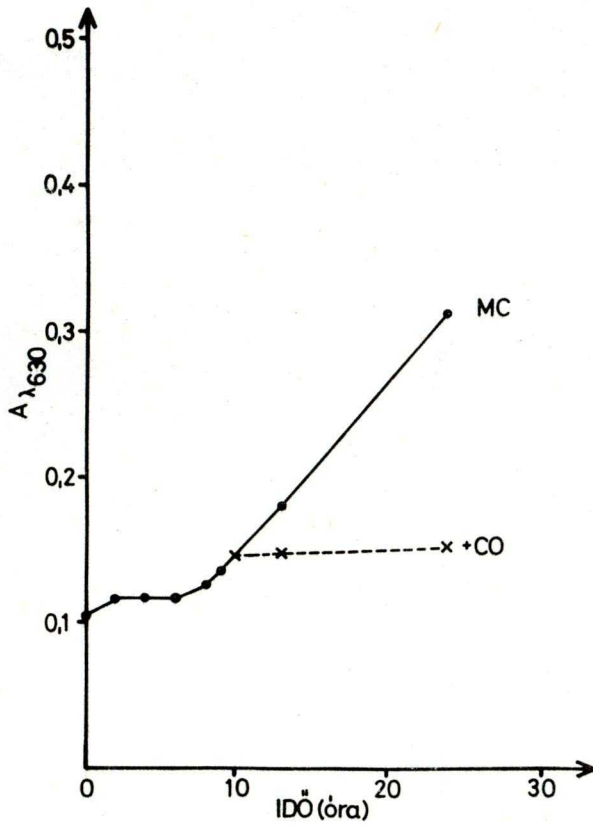
Az $1,7 \times 10^{-6} \text{ Mol/l Co/NO}_3/2$ koncentráció többszörösét adadolva a tápoldathoz az algák pigment rendszere nem regenerálódott. A klorofill és a fikocianin szintézis teljes mértékben gátolt /6., 7. ábra/, a pigment szintézis leállása az alga sejtek elhalásához vezetett.





6. ábra. A. nidulans sejtszuszpenzió abszorpciós spektrumának 680 nm-nél /klorofill/ mért abszorpciós értékeinek időbeni változása. A tápoldatban a Co^{2+} -ionok koncentrációját a regeneráció megkezdését követő 11. órában $2,55 \times 10^{-5} \text{M}$ -re növeltük. A szaggatott vonal a kobalt kezelt minta klorofill sávjának OD értékeinek változását mutatja, míg a folytonos vonal a kontroll alga sejtszuszpenzióban mérhető értékeket.

MC = ?

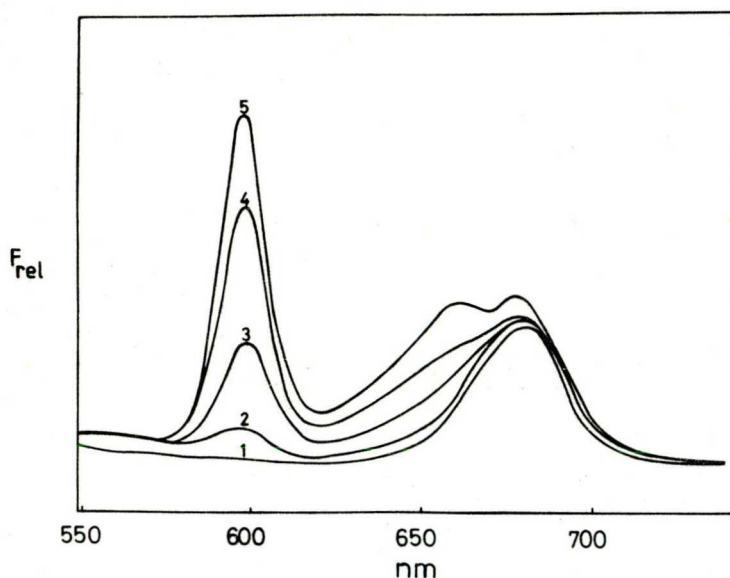


7. ábra. 630 nm-nél mérhető fikocianin OD értékeinek időbeni alakulását mutatja be a 6. ábránál már bemutatott körülmények között.

Mn²⁺ gátlás

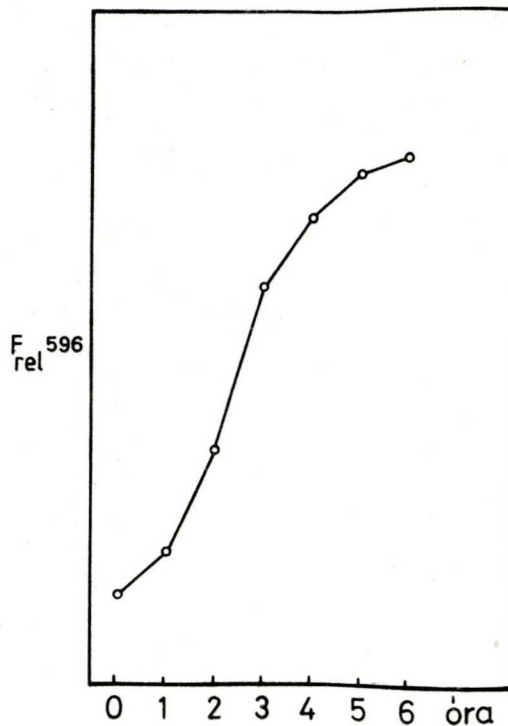
A komplett tápoldatban alkalmazott mangán-ion koncentrációhoz képest megnövelt mangán-ion koncentrációt adagolva az alga tápoldathoz az alga szuszpenzió fluoreszcencia spektrumában egy új, 596 nm-es emissziós sáv jelent meg. A vékonyréteg kromatográfiás analízis és spektrális tulajdonságai alapján a sávhoz rendelhető porfirint Mg PROTO-nak azonosítottuk.

Különböző mangán-ion koncentrációkat adagolva az előzőleg nitrát éheztetett alga szuszpenziójához megállapítottuk, hogy a mangán-ion koncentráció növelése a Mg PROTO felhalmozódás növekedését okozta. /8. ábra/



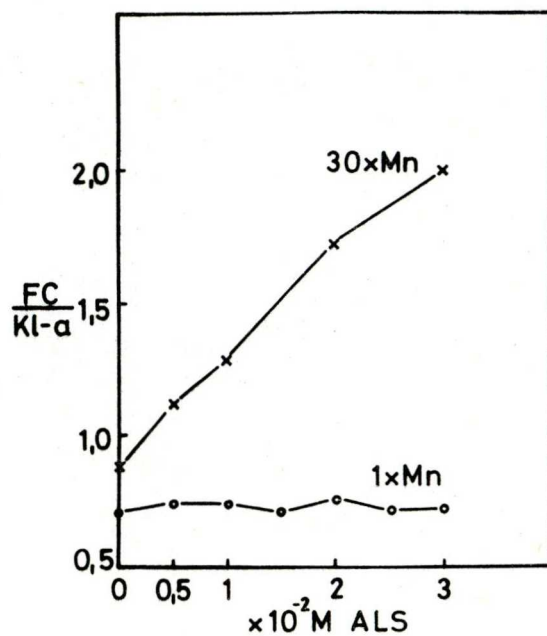
8. ábra. A. nidulans sejtek fluoreszcencia szinképének változása a Mn²⁺-ionok koncentrációjának hatására. Az 1-5-ig számozott szinképek a komplett tápoldat 9×10^{-6} M MnCl₂ tartalmának 1, 5, 10, 20, 40 szeresét jelzik.

A Mg PROTO sáv kialakulása gyorsan történik /9.ábra/.



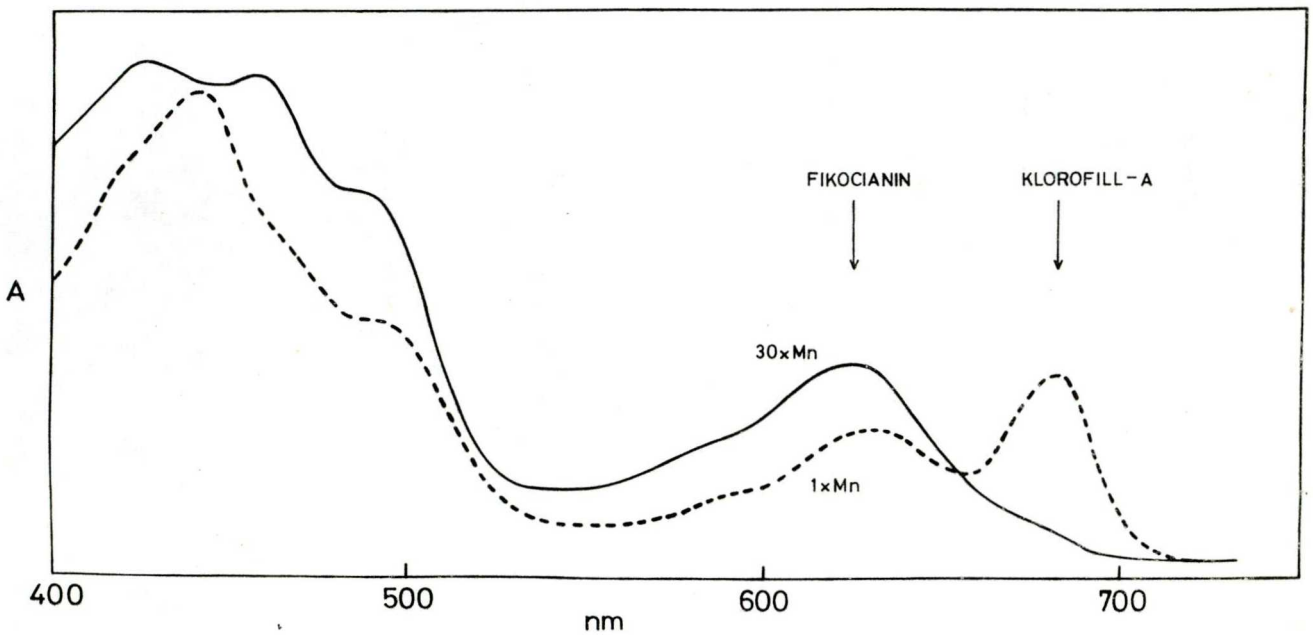
9. ábra. 40 szemes $MnCl_2$ -t tartalmazó tápoldatban regenerálódó *A. nidulans* sejtek fluoreszcencia szinképében megjelenő 596 nm-es sáv /Mg PROTO/ időbeni kialakulása.

Anacystis szuszpenzióban a sejtek klorofill és fikocianin tartalmának aránya az utóbbi javára megváltozik a mangán kezelés hatására. Növekszik a fikocianin tartalom, és csökken a klorofill koncentráció /10. ábra/.



10. ábra. Nitrát éhezést követően regenerálódó *A. nidulans* sejtek fikocianin/klorofill arányának változása az ALS koncentráció függvényében. 30 szoros /x-x-x/ és egyszeres /o-o-o/ Mn^{2+} -ion koncentráció mellett.

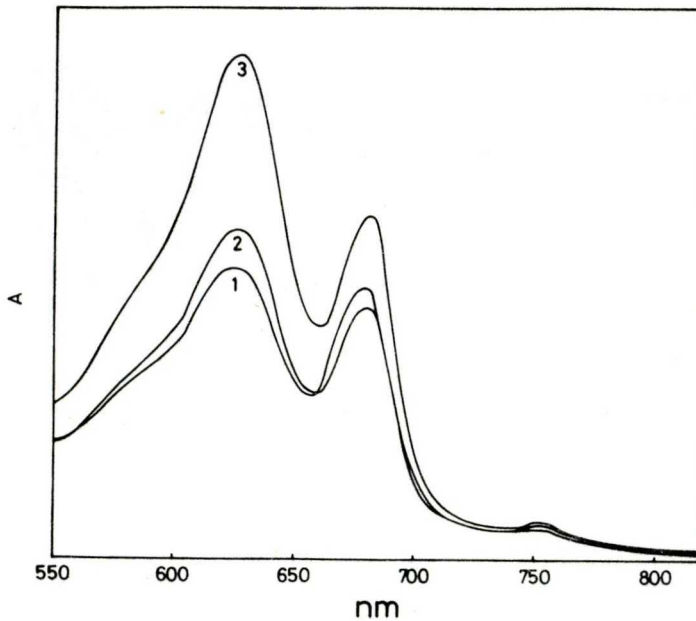
A regenerálódás során a mangán-ionok csak a klorofill szintézist gátolták /11. ábra/.



11. ábra. A nitrát éhezést követően regenerálódó *A. nidulans* sejtek abszorpciós spektruma 13 órával a komplett médium-ba történő visszahelyezés után / - - - / és $2,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ MnCl_2 -t tartalmazó médiumban / — / mindkét esetben a tápoldat $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ ALS-t tartalmazott.

III.2. Fe^{3+} aktiválás

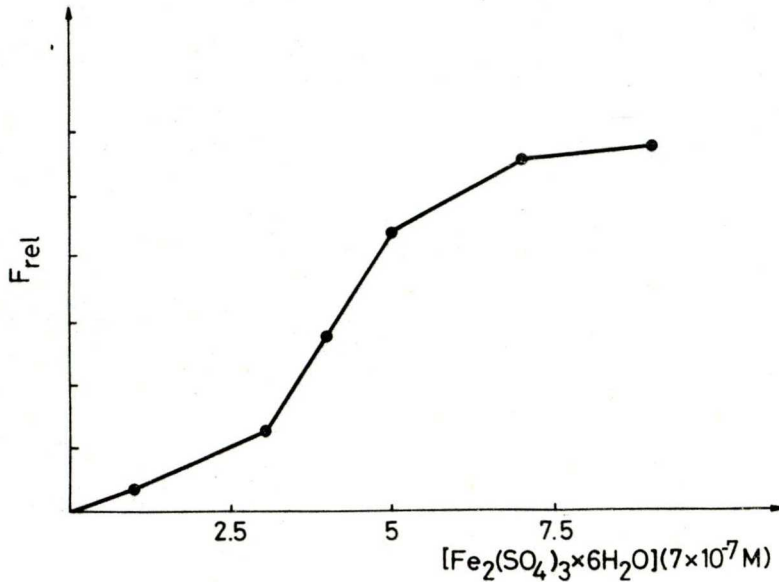
A tápoldat vas-ion koncentrációjának növelésével az *A. nidulans* sejt pigment tartalma növekedett. A 12. ábra különböző vas koncentrációju alga szuszpenziók abszorpciós spektrumát mutatja be.



12. ábra. Nitrát éheztetett *A. nidulans* sejtek szuszpenziójának abszorpciós spektruma 48 órával a komplett médium C-be való visszahelyezés után. Az 1, 2, és 3 görbék 1, 5, és 10 szeres vas koncentrációt tartalmazó médium C-ben növekedő alga szuszpenziók spektrumai. A médium C az előírás szerint $7 \times 10^{-6} \text{ M Fe}_2/\text{SO}_4/3$ -t tartalmaz.

A vas koncentrációját növelve elsősorban a 625 nm-nél mérhető fikobiliprotein elnyelése nőtt meg, de a vas jelenléte a klorofillek szintézisére is kedvezően hatott.

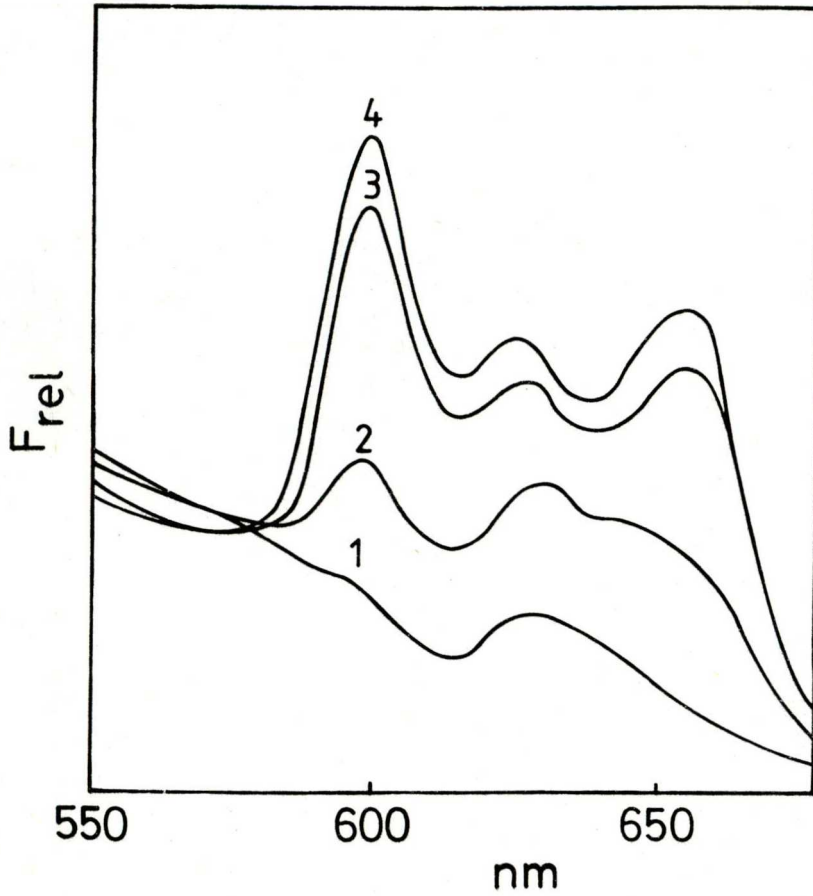
Ez a felgyorsult pigment bioszintézis együtt járt az alga szuszpenzió fluoreszcencia spektrumának változásával, egy új 615 nm-es sáv jelent meg /13. ábra/.



13. ábra. A 615 nm-es sáv relatív fluoreszcencia intenzitásának változása a tápoldat vas-ion koncentrációjának függésében. A gerjesztés hullámhossza 396 nm volt.

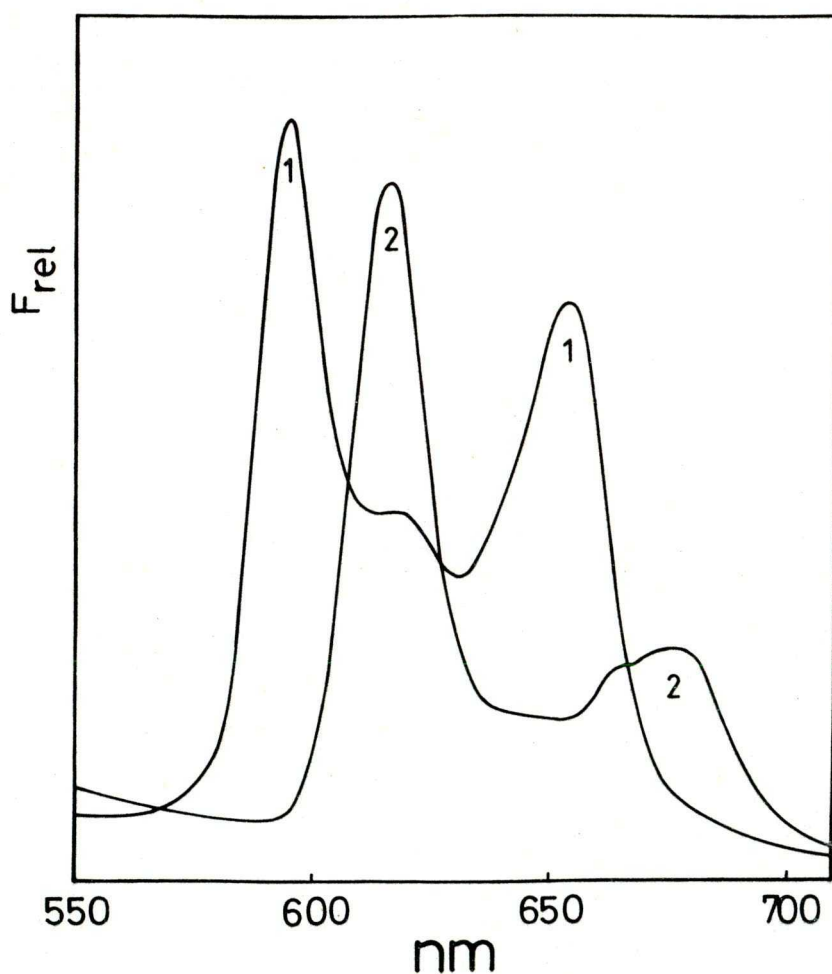
A sávhoz tartozó porfirint vékonyréteg kromatográfiás azonosítás és spektrális tulajdonságai alapján KOPRO III-nak találtuk. Az alga szuszpenziót 5000 g-vel centrifugáltuk és megállapítottuk, hogy a KOPRO III-at nem az alga sejtek, hanem a tápoldat tartalmazza. Az alga a KOPRO III-at kiválasztotta.

Az eukariota *Cyanidium caldarium* GGB mutánsával elvégezve ezt a kísérletet hasonló eredményt kaptunk. Növelve a médium vas koncentrációját egyre nagyobb KOPRO III kiválasztódást mértünk. /14. ábra/



14. ábra. A Cyanidium GGB mutánsának KOPRO III kiválasztása a médium vas koncentrációjának megnövekedésekor. Az 1-4 görbék az előírt $7 \times 10^{-5} M$ vas koncentrációnál 1, 5, 10 és 20-szor több vas-iont tartalmazó médiumban növekedő alga szuszpenziók fluoreszcencia spektrumait jelölik. Gerjesztési hullámhossz 396 nm.

A spektrumon látható 598 nm-es sáv jelenti a KOPRO III fő fluoreszcencia sávját. A pH nagymértékben befolyásolja a porfirinek fluoreszcencia sávjainak megjelenési helyét. A 15. ábra a savas és a lúgos pH-n megjelenő KOPRO III fluoreszcencia spektrumait mutatja be. Szerves oldószerek hatására is változik a sáv megjelenési hullámhossza /acetonos közegben 622 nm-nél jelenik meg az emissziós sáv/.

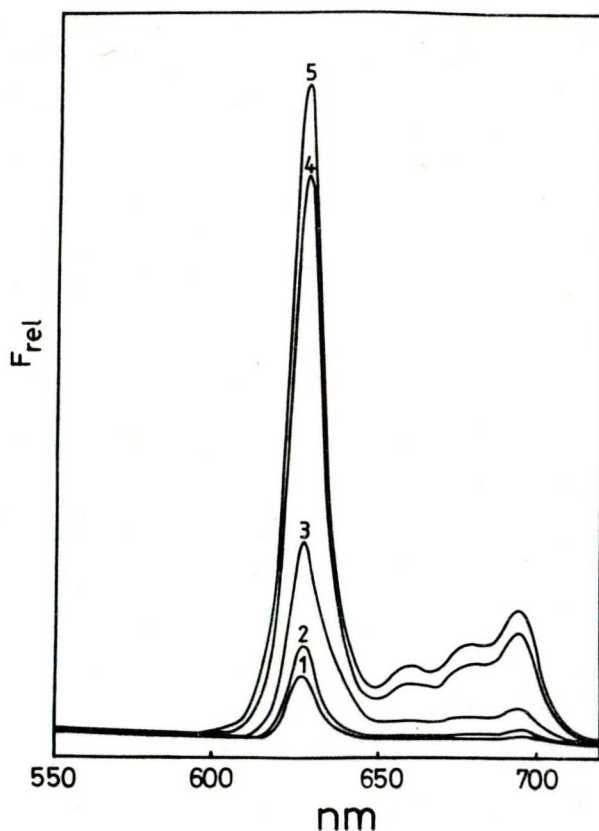


15. ábra. A KOPRO III savas /pH 3, 1. spektrum/ és lúgos /pH 8, 2. spektrum/ közegben felvett fluoreszcencia spektrumai. Gerjesztési hullámhossz: 396 nm.

III.3. ALS hatására történő KOPRO III kiválasztódása

GGB sejtekben.

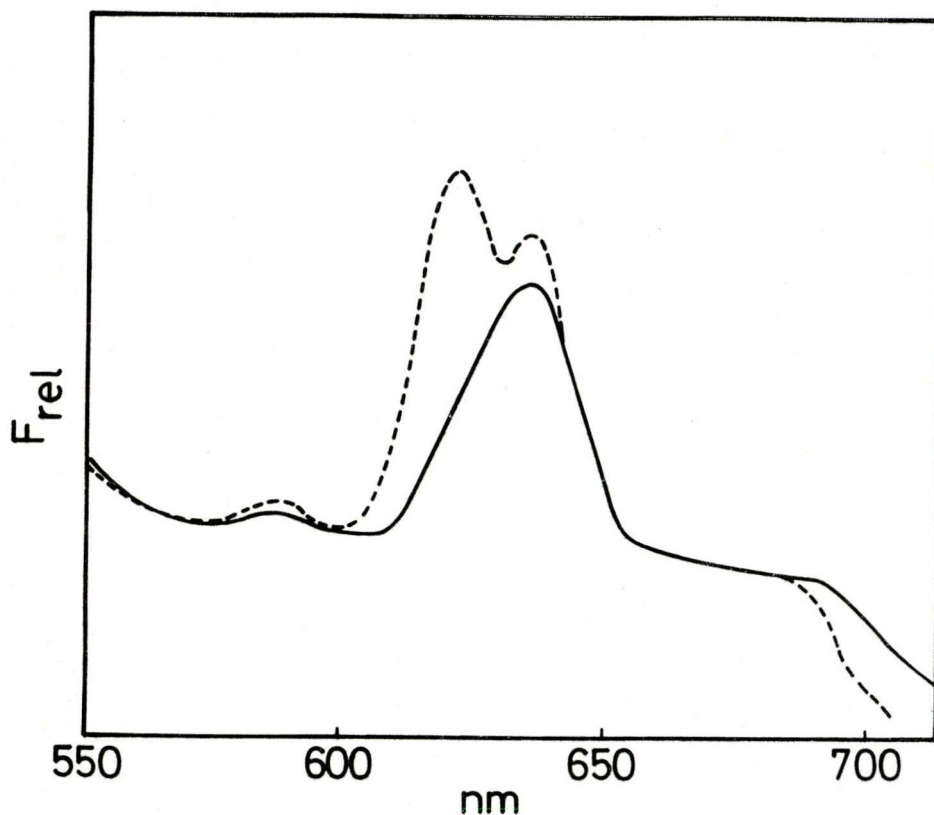
Sötétben nevelkedő GGB sejtekhez ALS-t adagolva szintén KOPRO III megjelenését észleltük. A sejtek a KOPRO III-at a tápoldatba választják ki. A KOPRO III felhalmozódás időtől függő folyamat, amit a 16. ábra mutat be.



16. ábra. A sötétben nevelkedő *Cyanidium* GGB mutáns sejtjei által a tápoldatba kiválasztott és abból ciklohexános módszerrel kivont KOPRO III fluoreszcencia spektrumának időbeni változása. A médium 10^{-2} M ALS koncentrációt tartalmazott. Az 1-5-ig számozott spektrumok az ALS kezelést követő 8, 14, 30, 58, és 82 órákat jelöli.

A fluoreszcencia spektrumokat aceton:metanol /4:1/ keverékben vettük fel, a gerjesztési hullámhossz: 396 nm.

Amikor a KOPRO III kiválasztódás a tápoldatban elér egy kritikus koncentrációt a sejteken belül is megfigyeltük a KOPRO III megjelenését /17. ábra/.



17. ábra. A Cyanidium GGB mutáns sejtjeinek fluoreszcencia spektrumai. A 72 óráig 10^{-2} M ALS koncentrációt tartalmazó tápoldatban nevelkedett /- - -/ és a kezeletlen alga sejtek /—/ fluoreszcencia spektrumai.

A 636 nm-es sávhoz a PROTO IX a 622 nm-es sávhoz a protein kötött KOPRO III tartozik. A sejteket friss médiumba felfuszpendáltuk és a spektrumokat erről a szuszpenzióról vettük fel. Gerjesztési hullámhossz: 396 nm.

Ekkor a sejtek már nemcsak KOPRO III-at választanak ki, hanem a tápoldatban az URO III is megjelenik.

A sejten belüli KOPRO III-at egy alacsony molekulasúlyú fehérjéhez kötve találtuk. A fehérje molekulaszúlyát gélszűrés segítségével meghatároztuk és azt 4 kD-nak találtuk.

IV. DISZKUSSZIÓ

A fém-ionok pigment szintézisre gyakorolt hatásának tanulmányozása már régóta a növényi biokémia kutatásainak középpontjában áll. Ezt elsősorban a fém-ionok okozta hiánybetegségek és az általuk kiváltott toxicitás miatt fellépő növényi károsodások indokolják. A megjelenő, klorotikus tünetekkel együttjáró megbetegedések jelentős károkat okoznak a mezőgazdaságban.

A kobalt-ionok tetrapirrol bioszintézisre gyakorolt gátlása már régóta ismert jelenség. *R. sphaeroides*-ben a kobalt-ionok a hem szintézisét gátolták /Lascelles, 1956/. Guzelian és Bissel /1976/ patkány májsejtekkel végzett kísérleteikben kimutatták, hogy a kobalt-ionok gátolják a hem és a P450 apoproteinjének összekapcsolódását. Hewitt és Nicholas /1963/ a kobalt-ionoknak a klorofill szintézisre gyakorolt gátlásának magyarázatát a kobalt-ionok változó vegyértékéből eredő oxidáló hatásában és erős komplexképző hajlamában keresték.

Saját kísérleteinkben úgy találtuk, hogy a kobalt-ionok az *A. nidulans*-ban meglévő mindkét tetrapirrol szintézis utat gátolják. A 6. és 7. ábrán bemutatott kísérleti eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kobalt a klorofillhez és a nyílt-láncu tetrapirrolokhoz vezető szintézis utakat egyaránt gátolja. A fluoreszcencia spektrumban megjelenő 636 nm-es emissziós sáv, mely a PROTO IX felhalmozódást jelzi a kobalt gátlás következménye.

A kobalt-ionok a hem szintézist, vagy a hem és az apoprotein közötti kapcsolódást gátolják, megakadályozva ezzel egyfelől a fikobilinek, másfelől a fikobiliproteinek szintézisét. A klorofill szintézist a Mg PROTO kialakulásának megakadályozásával gátolja. A gátlás mechanizmusának e magyarázatát az támasztja alá, hogy a kobalt a porfirinekkal stabilabb komplexet képez, mint a vas, vagy a magnézium-ionok. A magyarázatot a CoPROTO kimutatása bizonyítaná be egyértelműen. A kimutatás technikai nehézségek miatt nem történt még meg.

Az $1.7 \times 10^{-6} \text{ M Co/NO}_3/2$ -ot tartalmazó tápoldatban a klorofill és fikocianin szintézist csak részlegesen gátolta. Ez a kobalt-ion koncentráció a PROTO IX tovább alakulását még megengedte, de nagy mértékben lelassította a szintézis sebességét, így lehetőség nyílt a PROTO IX-et követő szintézis lépések tanulmányozására. A 4. és 5. ábrán bemutatott kísérletek bizonyítékot szolgáltatottak arra, az eddig elsősorban szerkezeti megfontolások és néhány izotop jelöléses kísérlet alapján feltételezett, de in vivo, egy rendszeren belül még nem igazolt elképzelésre, hogy a PROTO IX a fikobilinek és klorofillek közös prekursora.

Hewitt és Nicholas /1963/ a mangán és kobalt gátlás hatóhelyét és a két gátlás hatásmechanizmusát azonosnak tételezik fel.

A. nidulans sejtszuszpenzával végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy a mangán-ionok a klorofill szintézist gátolják. A klorofill szint csökkenésével egyidejűleg a Mg PROTO felhalmozódása volt megfigyelhető. A mangán-ionok tehát a Mg PROTO utáni enzimatisz szintézis lépést gátolják, így semmiképpen sem tartható az az elképzelés, mely szerint a mangán és kobalt-ionok azonos helyen és módon gátolják a tetrapirrol szintézist. A Mg PROTO felhalmozódás nőtt a mangán-ion koncentráció növelésével /8. ábra/.

Hewitt és Nicholas /1963/ és a későbbiek során több szerző is a mangán toxicitást indukált vas-hiánynak gyanította.

Spiller és munkatársai /1982/ a Mg PROTO-t továbbalakító enzimet vas-függőnek találták. A mangán-ionok az A. nidulans tetrapirrol szintézisében is ennél a helynél gátolnak. A két adat alapján a mangán hatást indukált vas-hiánynak tartjuk, megerősítve ezzel a korábbi szerzők feltételezését.

Feltételezhető volt, hogy a fikocianin felé vezető szintézis ut zavartalanul folyik. Regeneráltatásos kísérleteink ezt igazolták.

A nyílt-láncu tetrapirrolok szintézisét a mangán-ionok nem gátolják /10. és 11. ábra/. Ha ALS-t adagoltunk az alga sejtszuspenzióhoz akkor a mangán-kezelt algákban csak a fikocianin tartalom növekedett, míg a klorofill tartalom fikocianinhoz viszonyított értéke csökkent /10. ábra/. A 11. ábrán bemutatott kísérlet közvetlenül mutatja a klorofill szintézis gátoltságát, illetve azt is, hogy a fikocianin szintézis zavartalanul folyik és a hozzáadott ALS miatt a kontroll sejtszuspenzióhoz képest a fikocianin tartalom nő a klorofill rovására.

A kobalt és mangán-ionok okozta gátlás segítségével bizonyíthattuk azt a bioszintézis sémát, mely szerint a klorofillek és nyílt-láncu tetrapirrolok szintézise a porfirin váz felépítéséig közös szintézis uton történik. Megerősítettük, hogy a PROTO IX az a porfirinszármazék, melynél a két szintézis út elválik egymástól és párhuzamosan halad tovább a fikocianin és a klorofill felé. Kísérletes bizonyítékot szolgáltatottunk arra, hogy a mangán toxicitás indukált vas-hiányt okoz és megállapítottuk a mangán és kobalt gátlás eltérő jellegét.

Legkülönbözőbb organizmusok sejtjei képesek porfirineket kiválasztani. A kiválasztás okának és mechanizmusának felderítésére széleskörű kutatómunka folyik /Vos és Koenan, 1970, Demain és White, 1971, Viljoen és munkatársai, 1975, Mezey és munkatársai, 1971/. Az ALS adagolás hatására bekövetkező porfirin kiválasztódás is ismert folyamat /Carell és Khan, 1964, Troxler és Bogorad, 1966, Rebeiz és munkatársai, 1970, Lascelles, 1978/. A kiválasztott porfirin a kísérletek nagy részében az URO III és a KOPRO III voltak. Nicholas és Rimington 1951-ben publikált közleményében több, a hem szintézis gátoltsága következményeként jelentkező megbetegedésnél mutattak ki porfirin felhalmozódást és kiválasztódást. A leggyakoribb tünet a KOPRO III kiválasztódás volt. Mindezek a megfigyelések már sejtették, hogy a KOPRO III-nak, mint tetrapirrolok bioszintézis korai, de már kialakult porfirin gyűrűvel rendelkező intermediérének reguláló szerepe van a szintézisben.

A KOPRO III kitüntetett szerepét támasztja alá az a tény is, hogy a tetrapirrolok közül a legnagyobb a víz oldékonysága /Gough, 1972/. A felsorolt kísérletek mindegyikében a KOPRO felhalmozódás és kiválasztódás oka a tetrapirrol bioszintézis valamelyik lépésében bekövetkezett gátlás volt.

Vas-hiány hatására is KOPRO III kiválasztás történik, ezért tartják a KOPRO-genázt vas-függő enzimnek. Hsu és Miller /1970/ a KOPRO-genázzal közvetlenül kimutatták, hogy vassal aktiválható.

A vas hatóhelye illetve hatóhelyeiről napjainkban is vita folyik. Más szerzők a Mg PROTO-t követő enzimatis lépésről mutatták ki, a vas-függést /Chereskin és Castelfranco, 1982, Jones, 1963/. A porfirin szintézis legkritikusabb, sebesség meghatározó enziméről az ALS szintetázról is kimutatták, hogy a vas-ionok többféle módon is hatnak rá. A vas-ionok a PROTO-ba épülve egy "feed back" negatív visszacsatolós mechanizmuson keresztül gátolják az ALS szintetáz enzim működését. Ez a gátlás emlős rendszerekben bizonyított tény, az algák és magasabb rendű növényekben még nem mutatnak ki hasonló gátlást, de feltételezik jelenlétét. A vas-ionok közvetlenül is hatnak az ALS szintetázra. Csirke sejtekből izolált ALS szintetáz aktivitását a vas-ionok 12 % -kal növelték, 10^{-6} M vas-ion koncentráció mellett.

Megvizsgáltuk a vas-ionoknak a *Cyanidium caldarium* vörös, és az *A. nidulans* kék-zöld algára gyakorolt hatását. Mindkét esetben a vas-ionok aktiváló hatását mutattuk ki.

Az *A. nidulans* sejtek a megnövelt van-ion koncentrációra a fikocianin növelésével válaszoltak. /12. ábra/ A nagy vas-ion koncentráció eredményeként mindkét algafaj KOPRO III-at választott ki a médiumba /13. és 14. ábra/. A jelenség okának azt tartjuk, hogy a felgyorsult tetrapirrol bioszintézist nem követi a protein szintézis sebességének felgyorsulása. A klorofillnek és a fikocianin szintéziséhez szükséges proteinek hiánya így gátló folyamatként jelentkezik a pigment szintézisben.

A KOPRO III kiválasztással az alga sejtek a PROTO IX felhalmozódása ellen védekeznek. A PROTO IX autofoto-oxidációt szenzitivizál. A nagy PROTO IX koncentráció az algák pusztulásához vezethet. Ezt akadályozza meg a KOPRO III kiválasztódás amit a KOPRO viszonylagos jó oldhatósága is elősegít.

A *C. caldarium* GGB mutánsával megismételtük Troxler és Bogorad /1966/ kísérletét. A kísérletben a szerzők a sötétben nevelhető alga sejtekhez ALS-t adagoltak és 7 különböző porfirin megjelenését figyelték meg a médiumban. Sötétben a pigment szintézis egyes lépései gátoltak, ez eredményezi a porfirinek felhalmozódását és kiválasztódását.

A porfirinek közül három azonosítását végezték el, míg a fennmaradó 4 porfirint vékonyréteg kromatográfiás adataik alapján a porfirin szintézis URO-tól PROTO-ig tartó dekarboxileződési lépéseinek közti termékeinek feltételezték. Megállapították, hogy a kiválasztott porfirinek közül a KOPRO III fordul elő legnagyobb mennyiségben. A KOPRO III kiválasztódást kísérletünk is megerősítette. Az időben követve a kiválasztódás folyamatát a KOPRO III megjelenését detektáltuk először /16. ábra/. Ezt a KOPRO III sejtben történő megjelenése követte. A KOPRO-nak sejtben való felhalmozódásával egyidőben észleltük az URO III megjelenését a médiumban. A GGB sejteket és a médiumot külön vizsgálva megállapítottuk, hogy a sejtek a kísérlet kezdetén PROTO IX-et és Zn PROTO IX-et tartalmaznak, ezek mellett a KOPRO III az ALS adagolás hatására jelenik meg a sejtekben. A médium KOPRO III-at és az ALS kezelés megkezdését követő 52. órától URO III-at tartalmazott.

A médiumban sem PROTO IX-et, sem a dekarboxileződési folyamat közti termékeit nem mutattuk ki. Ha a médiumból ciklohexanonos eljárással izolált porfirinek vékonyréteg kromatográfiás analizisét az idézett cikkben /Troxler és Bogorad, 1966/ leírt futtató közegben végeztük az URO-n és KOPRO-n kívül más fluoreszkáló anyagokat is megfigyeltünk.

A futtató közeget több napi állás után használva a KOPRO-ra és URO-ra jellemző kromatográfiás sávok eltűnését tapasztaltuk. A helyettük megjelenő új sávokat az URO és a KOPRO megfelelő Zn komplexált származékainak azonosítottuk.

Az azonosítást a megfelelő porfirin standard Zn kelálásával és a Zn porfirinek Rf és spektrális értékeinek meghatározása alapján történt. Megállapítottuk, hogy a minta átalakulása a vékonyréteg kromatográfiás vizsgálat alatt történt. A futtató szerben lévő lutidin, bázikus tulajdonsága miatt a Zn-ionok kelálódását katalizálta.

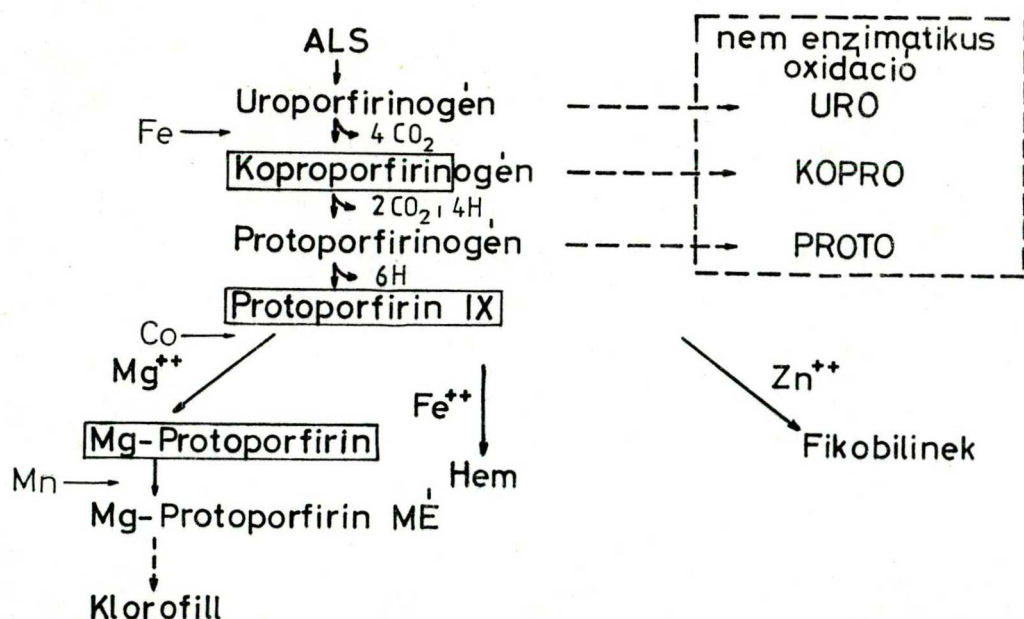
EDTA adagolásával a komplexképződést akadályozni lehet. Az alkalmazott EDTA koncentráció a Zn kelátok képződését csak részben gátolta. Troxler és Bogorad által talált számos fluoreszkáló vegyület megjelenése ezzel a műtermékként felhalmozódott Zn porfirinek képződésével magyarázható. Az irodalomban közölt EDTA koncentráció négyszeresét alkalmazva a Zn porfirinek képződését teljes mértékben gátolni tudtuk.

A sejtekben felhalmozódott KOPRO III-at közelebbről megvizsgálva /17. ábra/ kimutattuk, hogy az a sejtekben egy proteinhez kötve található. A sejtekből a szabad KOPRO-t csak savas hidrolízis után végzett ciklohexanonos extrakcióval lehetett izolálni. A proteinhez kötött tetrapirrol acetonos kezelés hatására kicsapódott, míg a szabad KOPRO-t az aceton jól oldja.

Ez a tény a protein KOPRO kötés kovalens jellegére utal. A KOPRO kiválasztódásról kimutatták, hogy energia igényes folyamat. NaF-al és 2,4-dinitrofenollal a kiválasztás gátolható /Viljoen és mtsai, 1975/. Nyúl vér sejtekben a KOPRO-t egy fehérjéhez, a homopexinhez kötve találták /Morgan és mtsai, 1975/. A hemopexin egy 57kD-os szállító fehérje. Az alga sejtekből izolálható protein komplex molekulasúlyát gélszűréssel meghatároztuk és azt 4kD-nek találtuk.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink egybevetése alapján úgy gondoljuk, hogy a KOPRO III-nak a tetrapirrol bioszintézisben reguláló szerepe van. A KOPRO-ig tartó szintézis út aktiválódása esetén, mint levezető csatorna működik megakadályozva a KOPRO utáni intermedierek felhalmozódását. Az esetleges felhalmozódás a későbbi szintézis lépésekhez szükséges fehérjék szintézisének lassúsága miatt következhet be. Az intermedierek felhalmozódása közül a PROTO IX felhalmozódás jelent különösen nagy veszélyt az alga sejtekre nézve. A PROTO IX rendkívül fényérzékeny, bomlása során szabad gyökök képződnek, melyek az alga sejteket el is pusztíthatják.

A KOPRO utáni szintézis lépések gátoltsága esetén is megfigyelhető KOPRO kiválasztódás, ami szintén egy védekező mechanizmusnak fogható fel. Az alga így is a PROTO IX nagyobb mértékű felhalmozódása ellen védekezik azzal, hogy a PROTO-t megelőző szintézis termékét a "reakció térből" eltávolítja. Ugy gondoljuk, hogy a kötött proteinek szállító funkciója van és a KOPRO proteinhez kötve jut ki a sejt felszínére.



18. ábra. Fém-ion függő tetrapirrol bioszintézis sémája A. nidulansban. /Labbe /1977/ sémáját alapul véve/



Ö S S Z E F O G L A L Á S

1. Kimutattuk, hogy a kobalt-ionok a tetrapirrol szintézist a PROTO IX-et követő lépésénél gátolják. A gátlás a nyílt-láncu és a gyűrűs tetrapirrolokra egyaránt hat. A klorofill és a fikocianin szintézis leáll és ez az algák pusztulásához vezet.
2. Alacsony kobalt koncentrációnál a szintézis nem áll le, csak jelentős mértékben lelassul. Ezek a körülmények lehetőséget biztosítottak a PROTO IX fikocianinná és klorofillá alakulásának egy rendszeren belüli, közvetlen, in vivo tanulmányozására. A kísérleti adatok alapján megállapítottuk, hogy a PROTO IX a pigment szintézis elágazási pontja.
3. A mangán-ionok gátlásának következményeként a Mg PROTO felhalmozódását észleltük az alga szuszpenzióban. A hatóhely megegyezik egy vasfüggő enzimatis lépéssel. A mangán-ionok indukált vas-hiányt okoztak. A mangán toxicitásról megállapítottuk, hogy annak oka az indukált vas-hiány miatt bekövetkező klorofill szintézis gátlás.
4. A fikobiliproteinek szintézise mangán-ionok jelenlétében zavartalanul folyik. A mangán-ionok hatására csak a klorofill szintézis gátlódik. Ez is azt bizonyítja, hogy a pigment szintézis a fikocianin és a klorofill felé vezető útja párhuzamosan halad. A kobalt gátlásnál kapott eredménnyel összevetve a mangán-ionok okozta pigment szintézis gátlást, bizonyítottuk, látjuk, hogy a pigment szintézis lehetséges utjai a PROTO IX-ig együtt haladnak. Az elágazási pont után egymástól függetlenül haladnak tovább.
5. Vas-ionok hatására a tetrapirrol szintézis aktiválódik. A sejtek klorofill és fikocianin tartalma növekedik. A pigment szintézis felgyorsulását KOPRO kiválasztódás kíséri.

6. Sötétben nevelkedett algákban az ALS adagolás KOPRO kiválasztódást indukált. A KOPRO kiválasztódást a médiumban jelenlévő KOPRO koncentrációjának időbeni növekedése jelezte. Egy adott koncentráció elérése után KOPRO megjelenését detektáltuk a sejten belül is és ezzel egy időben a tápoldatban URO jelenlétét mutattuk ki.
7. Egy aktivációs hatás eredményeként ugyanazt a porfirin származékot választotta ki az alga, mint a sötét okozta gátlás esetében. Ez alapján a KOPRO III-nak a pigment bioszintézisben betöltött szabályozó szerepet tulajdonítunk.

A KOPRO-t a sejteken belül egy 4kD-s proteinhez kötve találtuk. A protein a KOPRO szállításában és tultermelés esetén médiumba való kiválasztódásában játszhat szerepet.

A disszertáció anyagát a következő dolgozatok tartalmazzák:

1. Csatorday K., Gombos Z., és Szalontai B. Mn^{++} and Co^{++} Toxicity in Chlorophyll Biosynthesis Proc.Natl.Acad.Sci. USA közlésre benyújtva
2. Gombos Z., és Csatorday K. Coproporphyrin mediated regulation of tetrapyrrole biosynthesis Biochemistry közlésre benyújtva
3. Csatorday K., és Gombos Z. /1982/ Tetrapirrol bioszintézis kék algában in vivo Lumineszcencia konferencia Békéscsaba.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki Farkas Gábor akadémikusnak, hogy intézetében lehetővé tette munkám elvégzését. Köszönöm Csatorday Károlynak munkám során adott tanácsait és munkatársi segítségét. Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám során, és dolgozatom elkészítésében segítségemre voltak.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

- Allen M.B. /1959/ Arch.Mikrobiol. 32 270
- Barrett J. /1959/ Nature 183 1185
- Barrett J. és Clesy P.S. /1959/ Nature 184 1988
- Beale S.J. /1971/ Plant.Physiol. 48 316
- Beale S.J. és Castelfranco P.A. /1974/ Plant.Physiol 53 297
- Beale S.J. és Foley T. /1982/ Plant.Physiol. 69 1331
- Bergmann W. /1979/ Termesztett növények táplálkozási zavaraik előfordulása és felismerése. Mezőgazdasági Kiadó Bp.
- Bogorad L. /1955/ Science 121 878
- Bogorad L. /1958 a/ J.Biol.Chem. 233 501
- Bogorad L. /1958 b/ J.Biol.Chem. 233 510
- Bogorad L. és Granick S. /1953/ Proc.Natl.Acad.Sci,USA 30 1176
- Bogorad L. és Troxler R.F. /1967/ Biogenesis of Neutral Compounds szerk.Bernfeld.Pergamon Press, New York és Oxford 247
- Brown S.B., Holroyd J.A., Troxler R.F. és Offner G.D. /1981/ Biochem.J. 194 137
- Brown S.B., Holroyd J.A., Vernon D.I., Troxler R.F. és Smith K.M. /1982/ Biochem.J. 208 479
- Burnham B.F. és Lascelles J. /1963/ Biochem.J. 87 462
- Camadro J.M. és Labbe P. /1982/ Biochim.Biophys.Acta 707 280
- Carell E.F. és Khan J.S. /1964/ Arch.Biochem.Biophys 108 1
- Chereskin B.M. és Castelfranco P.A. /1982/ Plant.Physiol. 69 112
- Cookson G.H. és Remington C. /1953/ Nature 171 375
- Csatorday K., Mac Coll R. és Berns D.S. /1981/ Proc.Natl.Acad.Sci,USA 78 1700
- De Ciano S., Rodriguez S., Fehr W.R. és Andersson I.C. /1979/ Crop.Sci. 19 644
- Demain A.L. és White R.F. /1971/ J. Bacteriol. 107 456
- Demsey B., Lowe M.B. és Phillips J.N. /1961/ Hematin Enzymes. Pergamon Press, London 29

- De Matties F., Gibbs A.H. és Smith A.G. /1980/ Biochem. J. 189 645
- Ehteshamuddin A.F.M. /1968/ Biochem.J. 107 446
- Falk J.E. /1961/ J.Chromatogr. 5 277
- Falk J.E. /1975/ Porphyrins and Metalloporphyrins szerk. Smith K.M. Elsiever
- Fischer H. és Bock H. /1938/ H.Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 1 255
- Fischer H. és Orth H. /1934 és 1937/ Die Chemie des Pyrrols' Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig
- Fischer H. és Stern A. /1940/ Die Chemie des Pyrrols'
- Fischer H. és Zeile K. /1929/ Ann.Chem. 468 98
- Fitzpatrick M.B.P. és Deleo V.A. /1977/ J.Invest. Dermatol. 69 510
- Fuesler T.P., Wright L.A. és Castelfranco P.A. /1981/ Plant.Physiol. 67 246
- Furhop J.H. és Smith K.M. /1975/ Porphyrins and Metalloporphyrins, szerk.Smith K.M. Elsiever
- Gassman M.L., Plauscec J. és Bogorad L. /1968/ Plant. Physiol. 43 1411
- Gibson K.D., Laver W. és Neuberger A. /1958/ Biochem.J. 70 71
- Gibson K.D., Matthew M., Neuberger A. és Tait G.M. /1961/ Nature 192 204
- Godnev T.N., Rotfarb R.M. és Guardiyan V.N. /1966/ Dokl. Akad.Nauk,SSSR 169 1191
- Goldin B.R. és Little H.N. /1969/ Biochim,Biophys.Acta 171 321
- Gorcheim A. /1972/ Biochem.J. 127 97
- Gough S. /1972/ Biochim,Biophys.Acta 286 36
- Granick S. /1948/ J.Biol.Chem. 175 333
- Granick S. /1954/ Science 120 105
- Granick S. és Bogorad L. /1953/ J.Am.Chem.Soc. 75 3610
- Grigg S.R., Hamilton R.J., Jozeowicz M.L., Rochester C.H., Terell R.J. és Wickvar H. /1973/ J.Chem.Soc.Perkin,Trans. 2 407
- Guselian P.S. és Bissel D.M. /1976/ J.Biol.Chem. 251 4421

- Hinghigeri S.B. és Richards W.R. /1982/ 16 554
Houghton J.D., Honeybourne C.L., Smith K.M., Tabbá H.D.
és Jones O.T.G. /1982/ Biochem.J. 208 479
Hsu W.P. és Miller N.J. /1970/ Biochem.J. 117 215
Jacobs J.M., Jacobs N.J. és De Maggio A.E. /1982/ Arch.
Biochem.Biophys. 218 233
Jones M.S. Jones O.T.G. /1970/ Biochem.J. 119 453
Jones O.T.G. /1963/ Biochem.J. 86 429
Jones O.T.G. /1967/ Biochem.Biophys.Res.Comm. 28 671
Kipe-Nolt J.A. és Stevens S.E. /1979/ J.Bacteriol.
137 146
Kitchin K.T. és Farmer J. /1981/ Biochem.Biophys.Res.
Comm. 103 1172
Kratz W.A. és Myers J. /1954/ Am.J.Bot. 42 282
Küster W. /1912/ Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 82 463
Labbe R.F. /1959/ Biochim.Biophys.Acta 31 589
Labbe R.F. /1977/ Clin.Chem. 23 256
Lascelles J. /1956/ J.Gen.Microbiol. 15 404
Lascelles J. /1978/ The Photosynthetic Bacteria. szerk.
Clayton R.K. és Sistron W.R. Plenum Press. New York és
London 795
Laver W.G., Neuberger A. és Scott J.J. /1959/ J.Chem.
Soc. 1483
Lemberg R. /1928/ Justus Liebig's Annln.Chem. 461
Lemberg R. és Legge J.W. /1949/ Haematin Compounds and
Bile Pigments, Interscience New York
Liem H., Smith A. és Muller-Eberhard U. /1979/ Biochem.
Pharmacol. 28 1735
Machold O. és Stephan N.N. /1969/ Phytochem. 8 2189
Maneshin S.K., Bravicheva R.N., Zhukova Z.A., Zaikina A.J.
és Arevshatian A.A. /1974/ Mikrobiologia 6 1041
Mauzerall D. és Granick S. /1958/ J. Biol.Chem. 232 1141
Meller E. és Gassman M.L. /1982/ Plant.Sci.Lett. 26 23
Mezey F., Quartner J. és Nair P.P. /1971/ Biochem.Med. 5 30
Morgan W.T., Sutor R.P., Muller-Eberhard U. és Pentti K.
/1975/ Biochim.Biophys.Acta 400 415



- Morghan J.T. és Freeman T.J. /1978/ Soil.Sci.Soc.Am.J. 42 455
- Morghan J.T. és Rabowicz P. /1979/ Crop.Sci. 19 9
- Nandi D.L., Baker-Cohhen K.F. és Shemin D. /1968/ J.Biol.Chem. 243 1224
- Nandi D.L. és Shemin D. /1968/ J.Biol.Chem. 243 1231
- Neve R.A., Labbe R.F. és Aldrich R.A. /1956/ J.Am.Chem. Soc. 78 691
- Neuberger A. és Tait G. /1964/ Biochem.J. 90 607
- Nicholas E.H. és Rimington C. /1951/ Biochem.J. 48 306
- O'Carra P. és Colleran E. /1970/ J.Chromatogr. 50 458
- Óh Eocha C. /1968/ Porphyrins and Related Compounds, szerk.Goodwin T.W, Academic Press, London és New York
- Öquist G. /1971/ Plant.Physiol. 25 188
- Padamanaban G., Muthukrishnan S. és Sarma P.S. /1967/ Biochim.Biophys.Acta 141 190
- Porra R.J. és Irving E.A. /1972/ Arch.Biochem.Biophys 143 37
- Rebeiz C.A., Abou-Haidar M., Yaghi M. és Castelfranco P.A. /1970/ Plant.Physiol. 46 543
- Rebeiz C.A. és Castelfranco P.A. /1971/ Plant.Physiol. 47 24
- Rebeiz C.A., Matheis J.R., Smith B.B., Rebeiz C.C. és Dayton D.F. /1975/ Arch.Biochem.Biophys. 116 446
- Richter M.L. és Reinits K.G. /1982/ Biochim.Biophys. Acta 717 255
- Rosan J.A., Pike C.S., Golden M.L. és Freedman J. /1978/ Plant Soil 50 151
- Rozanova L.N., Kaloshnikov Yu.E. és Shubin L.N. /1978/ Fiziol.Rost./Mosc./ 25 836
- Sano S. és Granick S. /1961/ J.Biol.Chem. 236 1173
- Schmid R. és Shemin D. /1955/ J.Am.Chem.Soc. 77 506
- Shemin D. és Kumin S. /1952/ J.Biol.Chem. 198 827
- Shemin D. és Russel C.S. /1953/ J.Am.Chem.Soc. 76 4873
- Shibata K., Benson A.A. és Calvin M. /1954/ Biochim. Biophys.Acta 15 461

- Shetty A.S. és Miller G.W. /1969/ Biochim.Biophys.
Acta 185 485
- Spiller S.C., Castelfranco A.M. és Castelfranco P.A.
/1982/ Plant Physiol. 69 107
- Steer B.T. és Gibbs M. /1969/ Plant Physiol. 44 781
- Stephan N.N. és Machold O. /1968/ Z.Pflanzenphysiol.
61 98
- Stern A. és Klebs G. /1930/ Ann.Chem. 500 91
- Stobart A.K. és Thomas D.R. /1968/ Phytochem. 7 1313
- Tenhunen R., Marver H.S. és Schmid R. /1968/ Proc.Natl.
Acad.Sci,USA 61 748
- Troxler R.F. /1972/ Biochemistry 11 4235
- Troxler R.F. és Bogorad L. /1966/ Plant Physiol. 41 491
- Troxler R.F. és Brown A. /1970/ Biochim.Biophys.Acta
215 503
- Troxler R.F. és Dokos J.M. /1973/ Plant Physiol. 51 72
- Troxler R.F. és Lester R. /1967/ Biochemistry 6 3840
- Troxler R.F. és Lester R. /1968/ Plant Physiol. 43 1937
- Urata G. és Granick S. /1963/ J.Biol.Chem. 238 811
- van Heynigen S. és Shemin D. /1971/ Biochemistry 10 4676
- Viljoen D., Becker D. és Kramer S. /1975/ Comp.Biochem.
Physiol. A Comp.Physiol. 50 587
- Vos J.G. és Koenan J.H. /1970/ Toxicol.Appl.Pharmacol
17 656
- Warnick G.R. és Burnham B.F. /1971/ J.Biol.Chem. 246 6880
- Westall G.R. /1952/ Nature 170 614
- Willstätter R. és Mieg W. /1906/ Ann.Chem. 350 1
- Willstätter R. és Stoll A. /1928/ Investigation on
Chlorophyll. Science Press, Lencester,Ohio
- Wittenberg J. és Shemin D. /1949/ J.Biol.Chem. 178 47
- Wittenberg J. és Shemin D. /1950/ J.Biol.Chem. 185 103