

A MEMBRÁNLIPIDEK SZEREPE A NÖVÉNYEK FAGYTŰRŐKÉPESSÉGÉNEK KIALAKÍTÁSÁBAN

VÍGH LÁSZLÓ

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet

Korábbi vizsgálataink során már igazoltuk, hogy a különböző fagyűrő-képességű búzák hidegadaptációjuk során fagyállóságuk mértékének arányában képesek csökkenteni plazmamembrán lipidjeik mikroviszkozitását (VÍGH és mtsai 1979a). Ha a szobahőmérsékleten nevelt növények levélprotoplasztjai plazmamembránjain mért fluiditásszintek alakulását is tekintetbe vettük (VÍGH és mtsai 1979b), az edződést mint az „öregedési folyamatot” gátló hatást foghattuk fel.

Bár a legkülönbözőbb törekvések történnek a levelekből történő tiszta plazmamembrán frakció izolálására, a probléma ezideig nem oldódott meg. Mivel a plazmalemma fázisállapota a fagyűrőképesség kialakításában elsődleges szerepet játszik és ma már valószínű, hogy a fagykárosodás startreakcióinak ez a struktúra a színhelye, lipidösszetételének vizsgálatára áthidaló megoldások történtek. (VÍGH és mtsai 1983/a). Részben a több-kevesebb tisztasággal előállított plazmamebrándús frakciók extrahált lipidjeire, gyakrabban a totál lipidekből elkülönített és a plazmamembránra jellemző lipidfélésekre (foszfatidil kolin, foszfatidil etanolamin, szabad szterolok) vonatkozó adatokkal találkozhatunk az irodalomban. A különböző fagyűrőképességű búzák foszfolipidjeinek edződés közbeni akkumulációja (HORVÁTH és mtsai 1980) a fagykárosodáskor megfigyelhető és a foszfolipáz-D által katalizált szelektív degradációja (HORVÁTH és mtsai 1979), majd az aminoalkoholok felvételén alapuló membránmódosítás és fagyállóságindukció (HORVÁTH és mtsai 1981a, b 1982) több szempontból is alátámasztották a fentebb vázolt elképzeléseket. A fagyűrőbb genotípusok edzések az azok sejtmembránjaiban megmutatkozó lassúbb mértékű vagy gátolt öregedés többféle lipofil eredetű krioprotektív hatás együttesének eredője. A jobb fagyűrőképességű búzák alacsony hőmérsékleten több foszfatidil kolin és kevesebb szabad szterolt tartalmaznak. Valószínű, a zsírsavak telítetlenedésének szerepét csak az egyes foszfolipidek zsírsav molekulaszékekre történő elkülönítése révén érthetjük meg. Ezt még inkább az indokolja, hogy már az eltérő télállóságú és előedzett búzák izolált *totál foszfolipidjeiből* készített vezikulákon zsírsav-spinjelölőkkel mért fluid gél termotróp fázisátalakulások hőmérsékletértékei *tűkrözik* a fagyállóság várható mértékét (VÍGH és mtsai 1983/b).

További vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Egy sejt viszonylatában az egyéb, ráadásul megbízhatóan izolálható membránstruktúrában, mint pl. a kloroplasztisz tilakoid, történik-e a plazmamembránban megfigyeltékhez hasonló típusú és mértékű adaptáció hidegedződéskor?
2. Milyen kapcsolat van a levelek „in vivo” körülmények között megfigyelhető fagykárosodása, egy izolált sejtorganellum (tilakoid) membránlipidjeinek összetétele és fázisállapota, továbbá egy, a tilakoid membrán integritásával összefüggő folyamat (fény indukálta protontranszport) működésének hőmérsékletfüggése között?

Vizsgálati anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez a nagy fagyűrőképeségű Miranovszkaja 808 (Mir) és a fagyérzékeny mexikói eredetű Penjamo 62 (PEN) búzafajtákat választottuk. A csíranövényeket kezdetben 10 napig 20 °C-on üvegházban, majd ezt követően 1,5 °C-on további 4 hétig klímakamrában (hidegedződés) neveltük.

A kloroplaszt tilakoidok izolálását a növények leveleiből az edződés előtt és közben, hetente végeztük. Az izolációs médium (amely literenként 20 mM tricint, 250 mM NaCl-t, 20 mM Na-aszorbátot, 0,1% BSA-t tartalmazott, pH = 7,8) 100 ml-ével 10 g növényből kiindulva végeztünk homogenizálást, majd miracloth-on való szűrés után 3000 g-n 1 percre történő centrifugálást végeztünk. A kiülepedett nyers kloroplasztisz frakciót először 100 ml 5 mM-os NaCl-ban felszuszpendálva ozmotikus sokknak tettük ki, majd kétszer egymást követően 7 percre 20 000 g-n történő centrifugálással üleptítettük a tilakoid vezikulákat. (LINEBERGER és STEPONKUS 1980). A második tisztítás előtt a total klorofill tartalmat 100 µg/ml-re állítottuk be. Végző médiumként a kísérletek jellegétől függően használtunk vagy 15 mM NaCl-ot, 0,5 mM MgCl₂-t és 40 µM fenazin metoszulfátot (PMS) a fény indukálta protontranszport méréséhez, vagy 5 mM NaCl-t és 0–200 mM szukrózt tartalmazó oldatot a fagyasztási kísérletekhez.

A levélszeletek és a tilakoid szuszpenziók fagykárosodásának követéséhez a mintákat etanol fürdőbe helyeztük, a hőmérséklet beállítása programozható lineáris hőmérsékletszabályozóval történt.

A levelek fagykárosodásának fokát az elektrolitvesztés mérésével (TÓTH és mtsai 1980), a PMS közvetítésével előálló fény indukálta protontranszport változást GARBER és STEPONKUS szerint (GARBER és STEPONKUS 1976) határoztuk meg.

A tilakoid lipidek extrakciója, szétválasztása, a zsírsavak komplex lipidekből metilészterekké történő áteszterezése, a zsírsavmetilészterek és szterolok gázkromatográfiája a szokásos módon történt. Mind a tilakoid membrán

frakciók mind pedig a különböző tilakoid lipidek fázisállapotának, a fluid és gél fázisok jelenlétének eldöntésére a röntgensugár diffrakció módszerét alkalmaztuk (McKERSIE és mtsai 1975).

Az izolált membránpelletet ez esetben is 5 mM NaCl-ben vettük fel, majd a mintát relatív nedvességtartalmának (60%) beállítása után kapillárisba forrasztottuk. Philips 1030 típusú kamerával dolgoztunk, a diffrakciós mintázatot 1–2 órás expozíció után rögzítettük a megfelelő negatívon. A megvilágító sugár hullámhosszának, a sugárforrás és a minta távolságának, továbbá a mintázaton látható éles vagy diffúz gyűrűk sugarának ismeretében a Bragg-egyenlet segítségével kiszámítható volt az ún. szomszédos rácscik távolság. A biológiai membránok és membránlipidek vizes diszperzióiban a fluid alkállanc elrendeződésre a 4.6 Å-ös diffúz gyűrű jellemző, míg a különböző rendezettségi fokú (hexagonális, kvázihexagonális) gél fázisok az éles 4,15 és 3,75 Å-ös „rácslándóik” alapján ismerhetők fel.

Eredmények és értékelésük

Az 1. táblázatban a tilakoid membránok legfontosabb lipidkomponenseinek, a neutrális galaktolipideknek (MGDG, DGDG) az anionos szulfolipideknek és foszfatidil glicerolnak (SL, PG) továbbá a kis mennyiségben jelenlevő foszfatidil kolinnak (PC) a %-os arányát tüntettük fel a fagyűrű és fagyérzékeny búzafajtára, a hidegedzés előtti és utáni állapotokat összevetve. Ebből kitűnik, hogy mindkét növény az edzés előtt és után is főleg galaktolipideket tartalmaz tilakoidjaiban. Érdekes azonban, hogy míg a fagyűrű MIR a hidegedzés hatására megnöveli a DGDG mennyiségét, addig éppen ellenkezőleg, a PEN tilakoidban edződéskor csökken a komponens aránya. Bár kevés adat áll rendelkezésünkre a különböző galaktolipidek zsírsav specieszei vizes diszperzióinak fluid → gél fázisátalakulási hőmérsékletét illetően, köztudott, hogy

1. táblázat

A fagyűrű Miranovszkaja 808 (MIR) és a fagyérzékeny Penjamo 62 (PEN) búzák tilakoidjainak lipidösszetétele hidegedzés előtt (UH) és után (H)

Minta		%					
		PC	PG	SL	MGDG	DGDG	Tot GL
MIR	UH	5	10	10	52	23	75
	H	2	11	9	38	40	78
PEN	UH	2	8	8	56	26	82
	H	6	15	13	47	18	65

PC: foszfatidil kolin, PG: foszfatidil glicerol, SL: szulfolipid, MGDG: monogalaktozil diglicerid, DGDG: digalaktozil diglicerid, Tot GL: össz. galaktolipid

2. táblázat

A fontosabb komplex lipidek linolénsav tartalma mol %-ban edződés előtt (UH) és után (H) a MIR és PEN tilakoidjaiban

Minta		18 : 3 (mol %)				
		PC	PG	SL	MGDG	DGDC
MIR	UH	27	20	74	88	71
	H	12	15	4	88	81
PEN	UH	25	42	55	85	93
	H	22	35	2	87	79

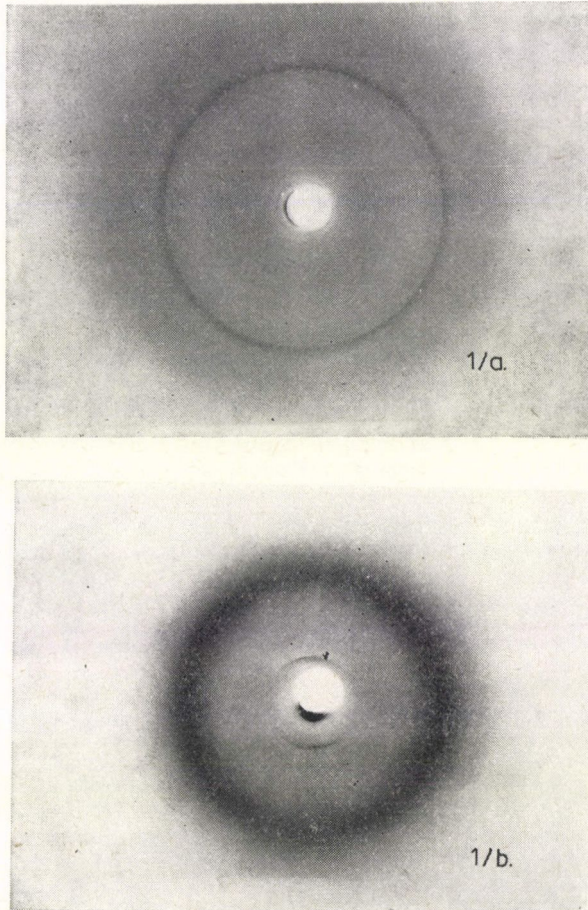
18 : 3 = linolénsav

az ugyanazon zsírsavakkal észterezett DGDC az MGDG-nél mintegy 20 °C-al alacsonyabb hőmérsékleten tranzicionál (SHIPPLEY és mtsai 1973). Az egyes komplex lipidek zsírsavkészletét gázkromatográfiásan vizsgáltuk, a legteljetelebb alkiláncú linolénsav %-os értékeit (a 16 : 0, 16 : 1, 16 : 3, 18 : 0, 18 : 1, 18 : 2 és 18 : 3 zsírsavak teszik ki a 100%-ot) a 2. táblázatban foglaltuk össze. A táblázat két érdekessége, hogy egyrészt mindkét növény galaktolipidjei elhanyagolható különbséggel azonos telítettségűek, másrészt, hogy edződés hatására a két foszfolipid és a SL erőteljesen csökkenti a 18 : 3 tartalmát. A zsírsav anyagszere edződés közbeni alakulásának megértése (de novo szintézis, transzfer, deszaturáció) további vizsgálatokat igényel.

A dolgozat korlátozott terjedelmére való tekintettel pusztán megemlítjük, hogy az edződés 0., 1., 2., 3. és 4. hetében megmértük a tilakoidok szabad szterol tartalmát és kifejeztük a szterolok és a már említett legfontosabb szerkezeti lipidek (gliko- és foszfolipidek) molarányát. Egyrészt megállapíthattuk, hogy a tilakoid szabad szterol tartalma rendkívül alacsony (1–200 szerkezeti lipidre jut 1 szterol), másrészt azt is, hogy a két növényben enyhén és azonos mértékben emelkedett a szterolszint az edződés tartama alatt.

Amint az köztudott, számos eljárás ismeretes a membránlipid-víz szerkezetek (bilayer, hexagonális I és II) továbbá az alkiláncok rendezettsége mértékének (határesetben fluid, ill. gél), ill. a mikroviszkozitásszint hőmérsékletfüggésének és ebből a termotróp fluid → gél fázisátalakulási hőmérsékletek értékeinek a meghatározására. Az ún. jelölős technikákkal, mindenekelőtt a fluoreszkáló és spinjelölt szondák membránokba történő bevitele útján pontos információkat szerezhetünk — ha lokalizációjuk kérdése tisztázott, akár az adott membránstruktúra izolációja nélkül is — a jelölő mikrokozonyzatának rendezettségéről és mikroviszkozitásáról is, sőt segítségükkel a diszkrét környezet hőmérséklet hatására bekövetkező változásai is nyomon követhetők. A fluid → gél fázisátalakulások kalorimetriás vizsgálata fontos termodinamikai paraméterek (pl. fázisátalakulási hő) számítását teszik lehetővé. A felsorolt módszerek egyike sem alkalmas azonban arra, hogy segítségükkel eldöntsük,

vajon a vizsgálni kívánt hőmérsékleteken az alkilláncok csak fluid, csak gél vagy esetleg fázisszeparált állapotban vannak-e. Az általunk használt röntgensugár diffrakciós módszer előnye éppen abban állt, hogy eldönthettük mind a vizsgált tilakoid membránokról, mind pedig a belőlük izolált galaktolipidek, foszfolipidek és egyéb membránalkotó lipidek vizes diszperzióiról, hogy folyadék-kristályos vagy szilárd-gél állapotúak-e. A módszer alkalmazhatóságának illusztrációjaként az 1. ábrán (a és b) a dipalmitoil foszfatidil kolin (DPPC) és a főleg telítetlen zsírsavakkal észterezett szójabab lecitin (SPC) vizes diszperzióinak mintázatát (20 °C) hasonlíthatjuk össze. A DPPC alkilláncok szobahőmérsékleten már kizárólag ($T_c = 41$ °C) szilárd-gél elrendeződése a 4,16 Å Bragg állandójú éles gyűrű, míg a SPC még folyadék-kristályos állapota a 4,6 Å-nál centrálódó diffúz gyűrű alapján tisztán felismerhető. Az izolált tila-



1. ábra. Foszfolipid-víz diszperziók röntgensugár diffrakciós mintázatai 20 °C-on. (a: dipalmitoil foszfatidil kolin, b: szójabab lecitin)

3. táblázat

A röntgensugár diffrakciós mintázat alapján felismerhető fluid (F) és gél (G) fázisok előfordulása az edződés közben a MIR és a PEN intakt tilakoidjaiban. (A mintázatokat 20 °C-on rögzítettük. A rácstávolságok értékeit Å-ben adtuk meg)

A hardening hetei	MIR	Észlelt fázisok	PEN
0	F (4,60)	F (4,60)	G (4,16)
1	F (4,60)	F (4,60)	G (4,16)
2	F (4,60) G (4,16)	F (4,60)	G (4,16)
3	F (4,60) G (4,16)	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)
4	F (4,60) G (4,16)	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)

4. táblázat

Lipid fázisok a teljesen edzett (1,5 °C, 4 hét) búzák tilakoidjaiban és az azokból kivont lipidek vizes diszperzióiban, 20 °C-on és -15 °C-on

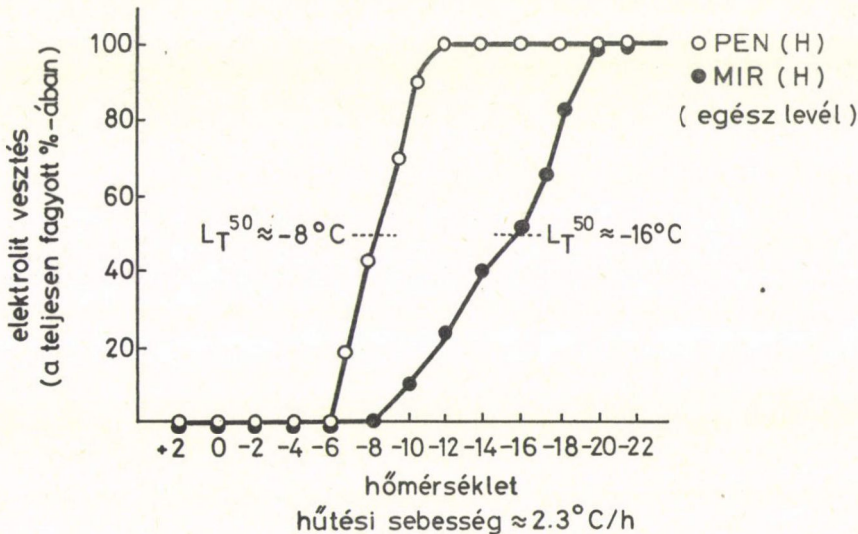
Növény	Minta	Észlelt fázisok			
		20 °C		-15 °C	
MIR	TH	F (4,60)	G (4,16)	F (4,60)	G (4,16)
	TL	F (4,60)	G (4,16)	F (4,60)	G (4,16)
	GL	F (4,60)		F (4,60)	
	GL + PL	F (4,60)		F (4,60)	
	GL + PL + NL	F (4,60)	G (4,16)	F (4,60)	G (4,16)
PEN	TH	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)
	TL	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)
	GL	F (4,60)		F (4,60)	
	GL + PL	F (4,60)		F (4,60)	
	GL + PL + NL	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)	F (4,60)	G (4,16 + 3,75)

TH: tilakoid, TL: össz. lipidek, GL: galaktolipidek, PL: foszfolipidek, NL: neutrális lipidek

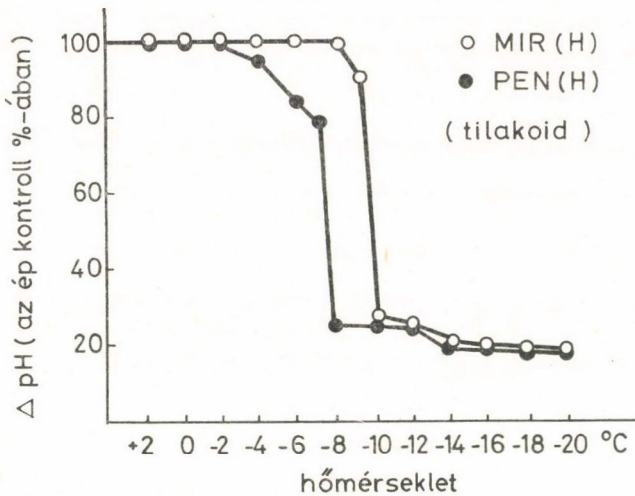
koid membránok 20 °C-on rögzített mintázatai alapján a fluid és gél fázisok önálló vagy együttes előfordulását az edződés 0., 1., 2., 3. és 4. hete után mindkét fajtára a 3. táblázatban adtuk meg. A 3. táblázat adatait elemezve az alábbi következtetéseket vonhatjuk le. Egyrészt, hogy minden alacsony hőmérséklet kezelés nélkül, a még edzetlen és így fagyűrőképeségében alig különböző két növény közül a később edzéssel télállóvá tehető tilakoid lipidjei fluid, a tavaszi fajta esetében pedig már fluid/gél fázisszeparált formában vannak. Az edződés előrehaladtával — hasonlóan a 29 °C-on, etiolálva nevelt bab szikleveleiből nyert plazmamembrán frakció öregedéséhez (McKERSIE és mtsai 1976) — a 2. héttől már mindkét fajta tilakoidjaiban fázisszeparáció található. További különbség a fajták között, hogy a PEN tilakoidban a 3. és 4. hét végén a 4,16 Å-ös éles gyűrűn kívül egy újabb, 3,75 Å-ös gyűrű is található: az irodalmi adatok szerint valószínűleg az ún. torzult hexagonális alkilánc-elrendeződés eredményeként.

A továbbiakban az intakt tilakoidok fázisállapotának hőmérsékletfüggését vizsgáltuk edződés előtt és után levő növényekből végezve az izolálást. A 20 °C és -15 °C között 5 °C-onként felvett mintázatokat kiértékelve megállapíthattuk, hogy a kiindulási állapotokhoz képest (UH és H MIR és PEN, 20 °C) a hőmérséklet csökkentése az említett hőmérséklet-tartományban nem eredményezett fázisátalakulást: azaz edződés előtt a MIR fluid a PEN fázisszeperált, edződés után mindkét növény tilakoidja fázisszeperált maradt. Újabb részletek váltak érthetővé a fázisszeperáció eredetét illetően a tilakoid, tilakoid totál lipid, ill. az utóbbiból oszlopkromatográfiásan elválasztott foszfo- és galaktolipidek vizes diszperzióinak összehasonlító vizsgálatával. A 4. táblázatban feltüntetett, teljesen edzett (4. hét) MIR és PEN tilakoidjaira, illetve — fentebb említett — lipidfrakcióik vizes diszperzióinak 20 °C-on és -15 °C-on rögzített mintázataira vonatkozóan két következtetés látszik érdekesnek. Egyrészt, hogy mindkét fajta extrahált tilakoid lipid-vezikulái 20 °C-on és -15 °C-on egyaránt pontosan olyan mintázatot adtak, mint az eredeti intakt tilakoid, következésképpen a fehérje-lipid kölcsönhatás nem befolyásolta alapvetően a hidrofób öv fázisállapotát. Másrészt, hogy a galakto- és foszfolipidek önmagukban -15 °C-ig fluidak voltak, ám az egyéb neutrális lipidek (klorofilok, karotenoidek, plasztokinonok, számos nem azonosított lipidoldékony vegyület) jelenlétében a fázisok ismét szeperálódtak. A funkcionális lipidek itt megfigyelt „rigidizáló” hatása elméleti szempontból is igen érdekesnek látszik.

Hogy a bevezetőben feltett kérdéseket megválaszoljuk, összehasonlítottuk tettünk az edzett növények leveleinek programozott fagyasztásakor megfigyelhető elektrolitvesztése (2. ábra) és az ugyanezen levelekből izolált tilakoid



2. ábra. Az egész levelek elfagyási görbéje. A sejtkárosodással arányos elektrolit kiáramlást vezetőképesség mérésrel határoztuk meg



3. ábra. A tilakoid fény indukálta protontranszport változása fagyasztáskor

membránok „épségéről” tájékoztató fény indukálta protontranszportáló képesség a fentiekkel azonos körülmények között (a hőmérséklet csökkentés sebessége = 2,3 °C/h, lassú felmelegítés +4 °C-on, mintavétel 1–2 °C-onként) mérhető értékei között (3. ábra). A 2. és a 3. ábrából kitűnik, hogy az egész levelek elfagyásának (–6 °C PEN és –8 °C MIR), ill. a protontranszportáló képesség csökkenésének (–4 – 6 °C PEN és –8 – 9 °C MIR) kezdete fagyasztáskor lényegében egybeesik. Amíg azonban a levelek fagyásgörbéje hosszan elnyúló, –6 °C és –10 °C között a PEN-é, ill. –8 °C és –18 °C között a MIR-é – egyébként az ily módon leolvasható „félhalálzási” hőmérséklet értékei (LT₅₀PEN = –8 °C, MIR = –16 °C) tükrözik a két búzafajta valóságos, szántóföldi körülmények között is megfigyelhető fagyállóságbeli különbségét – addig a tilakoid „túlélése” a MIR esetében sem tart tovább –10 °C-nál.

Összefoglalás

A fentiekből kitűnik, hogy protontranszportáló képességének megszűnte alapján – amit valójában inkább a membrán megrepedezése miatt az azonnali depolarizáció eredményez – a tilakoid membrán egy viszonylag szűk, és a vártnál (l. korábban a galaktolipidek tranzíciós hőmérsékletét) jóval *magasabb* hőmérséklet-tartományban károsodik. A tilakoid ilyen nagyfokú érzékenysége *in vitro*, továbbá ugyanezen tilakoid már 20 °C-on röntgensugár diffrakcióval kimutatható fázisszeparációja jó összhangban vannak egymással. A tilakoid funkcionális lipidjeinek a magas telítetlenségű galakto- és foszfolipidek alkil-láncai rendezettségi fokát növelő hatása önmagában is rendkívül érdekes, és további vizsgálatokat kíván.

Végül megállapíthatjuk, hogy bár észleltünk kisebb különbséget a két-féle, megfelelően hidegedzett búzafajta tilakoid membránjai lipidösszetételében, fázisállapotában és egy funkciójának fagyérzékenységében, e különbség jóval csekélyebb, mint az akár az *in vivo* túlélés, akár az ezzel pozitív korrelációt mutató PL tranzíciók értékei alapján várható volt. Következésképpen, ismertetett eredményeink közvetve, de ismételten a *nem fotoszintetikus membránok* — így pl. a plazmamembrán — hőmérsékletadaptációban betöltött szerepének fontosságát húzzák alá.

IRODALOM

- GARBER, M. P. és STEPONKUS, P. L.: *Plant Physiol.* **57**, 681—686 (1976).
 HORVÁTH, I., VÍGH, L., BELEA, A. és FARKAS, T.: *Physiol. Plant.* **45**, 57—62 (1978).
 HORVÁTH, I., VÍGH, L., BELEA, A. és FARKAS, T.: *Physiol. Plant.* **49**, 117—120 (1980).
 HORVÁTH, I., VÍGH, L. és FARKAS, T.: *Planta* **151**, 103—108 (1981a).
 HORVÁTH, I., VÍGH, L., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I. és DUDITS, D.: *Planta* **153**, 476—480 (1981b).
 LINEBERGER, E. D. és STEPONKUS, P. L.: *Cryobiology* **17**, 486—494 (1980).
 MCKERSIE, B. D., THOMPSON, J. E. és BRANDON, J. K.: *Can. J. Bot.* **54**, 1074—1079 (1976).
 SHIPPLEY, G. G., GREEN, J. P. és NICHOLS, B. W.: *BBA* **311**, 531—540 (1973).
 TÓTH, E. T., VÍGH, L., KARVALY, B. és FARKAS, T.: *Physiol. Plant.* **48**, 340—346 (1980).
 VÍGH, L., HORVÁTH, I., HORVÁTH, L. I., DUDITS, D. és FARKAS, T.: *FEBS Letters* **107**, 291—295 (1979a).
 VÍGH, L., HORVÁTH, I., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I. és DUDITS, D.: *Advances in protoplast Research*, Academic Press, Budapest 457—463 (1979b).
 VÍGH, L., HORVÁTH, I. és FARKAS, T.: *Biológia aktuális problémái* **26**, 169—203 (1983a).
 VÍGH, L., HORVÁTH, I., WOLTJES J., FARKAS, T., VAN HASSELT P., KUIPER, P.J.C., megjelenés alatt (1983b).