



SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENIE MIERY INHIBÍCIE ELEKTRÓNOVÉHO TRANSPORTU V CHLOROPLASTOCH VO FOTOSYSTÉME II

Jiří Kos

Recenzia:

prof. PharmDr. Josef Jampilek, Ph.D.

Katedra chemické biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

doc. RNDr. Radoslav Halko, PhD.

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

Pod'akovanie:

RNDr. Katarína Kráľová CSc., Ing. František Šeršeň Csc.



1 Úvod do problematiky

Farmaká spoločne s pesticídmi sú navrhované tak, aby cielene pôsobili na konkrétne bunkové funkcie. V niektorých prípadoch sa ich terče pôsobenia prekrývajú, pretože farmaká a pesticídy ovplyvňujú totožné molekulárne procesy. Avšak dôsledky inhibície určitých molekulárnych cieľov môžu byť u rastlín a zvierat úplne odlišné. Účinok viac ako polovice komerčne dostupných herbicídov, a tým aj inhibícia fotosyntézy, je sprostredkovaný reverzibilnou väzbou na fotosystém II (PS II), proteínový komplex v membránach tylakoidov, ktorý katalyzuje oxidáciu vody a redukciu plastochinónu.

1.1 Chloroplasty

Chloroplasty sú bunkové organely, ktoré obsahujú farbivo chlorofyl. Iba tieto organely sú v rastlinných bunkách fotosynteticky aktívne. Majú schopnosť v procese fotosyntézy premeniť energiu vo forme slnečného žiarenia na energiu chemickú. Fotosynteticky významné pigmenty, chlorofyly a karotenoidy, sú vďaka svojej štruktúre so systémom konjugovaných dvojitych väzieb schopné absorbovať viditeľné svetlo. Podľa vlnovej dĺžky, v ktorej prebieha absorpcia svetelného žiarenia, rozlišujeme 2 typy chlorofylu *a*: P 700 a P 680, a podľa nich rozlišujeme dva fotosystémy (viď sekcia 1.3).

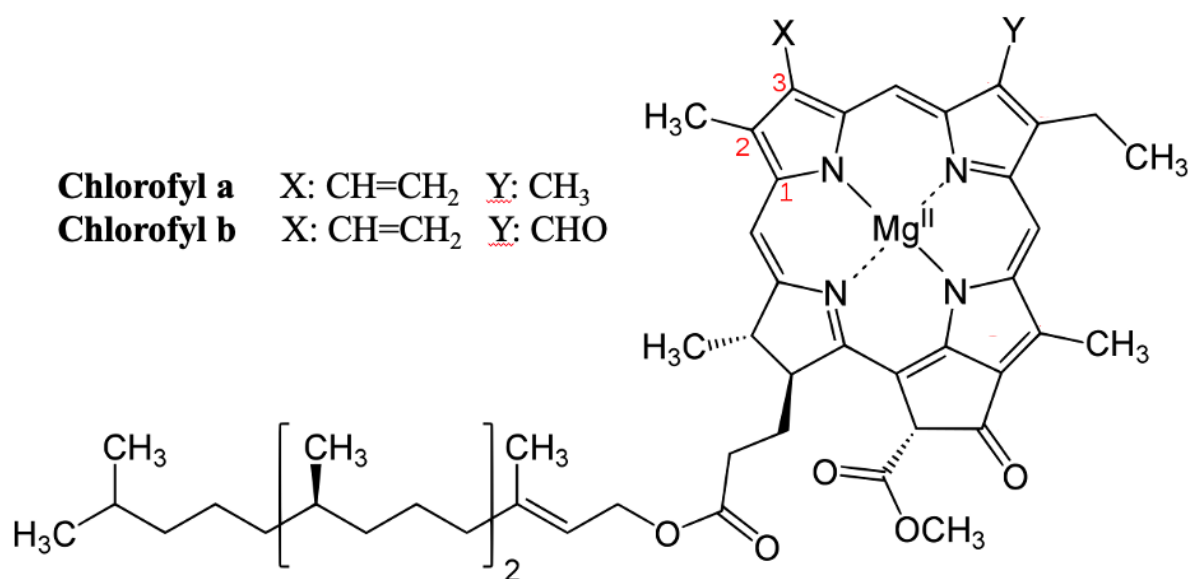
Veľkosť, počet a tvar chloroplastov sú ovplyvnené druhom rastliny, jej ontogenetickým štádiom a prostredím. Vo všeobecnosti má tento druh plastidov vyšších rastlín tvar šošovky, dĺžku 4-8 μm a šírku 2-5 μm . Chloroplasty ohraničuje od cytoplazmy dvojité membrána – vonkajšia a vnútorná – ktoré sa od seba líšia zložením a priepustnosťou. Medzi nimi sa nachádza periplastidový priestor. Vonkajšia membrána je charakteristická silnou priepustnosťou, pričom vnútorná membrána sa považuje za takmer nepriepustnú.

Vnútro chloroplastu tvorí základná hmota nazývaná stróma s tzv. membránovým systémom chloroplastov, v ktorom sa nachádzajú asimilačné farbivá. Základnou štruktúrnou jednotkou chloroplastu je tylakoid zložený z membrány a jeho vnútorného priestoru, nazývaného lúmen. Tieto membránové štruktúry sú v stróme chloroplastu uložené ako tylakoidy grán tesne vo vrstvách alebo ako tylakoidy strómy, keď majú podlhovastý tvar a spájajú dva a viac grán medzi sebou. V stróme sa ďalej vyskytuje aj plastidová DNA, plastidové ribozómy, škrobové zrná, plastoglobuly vznikajúce rozpadom membrán tylakoidov a tiež systém enzýmov potrebných pre metabolizmus a fotosyntézu.

1.2 Chlorofyl

Chlorofyl je fotosynteticky aktívny pigment nachádzajúci sa v nadzemných častiach vyšších rastlín, saniciach a riasach. Je zelenej farby, lebo absorbuje modrú a červenú časť svetelného spektra a ostatné odráža. V chloroplastoch sa nachádza viazaný na proteín na membránach tylakoidov spolu s ďalšími fotosynteticky aktívnymi pigmentami.

Chlorofyly sú organické farbivá tetrapyrolového charakteru s komplexne viazaným horečnatým kationom Mg^{2+} , kde sú 4 pyrolové jadrá navzájom prepojené metylénovými mostíkmi ($-CH=$). Na takúto porfyrínovú štruktúru je naviazaný dlhý uhl'ovodíkový reťazec – fytol (viď obrázok 1). Vo všeobecnosti poznáme viacero typov chlorofylov, ale z chloroplastov vyšších rastlín môžeme vyčleniť chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Rozdiel v ich štruktúre je iba v substituentu na 3. uhlíkovom atóme. V chlorofyle *a* je na tom mieste naviazaná metylová skupina, v chlorofyle *b* aldehydová skupina.



Obrázok 1: Chemická štruktúra chlorofylu *a* a chlorofylu *b*.

Chlorofyly absorbujú svetlo v modrej (400 – 500 nm) a červenej (600 – 700 nm) oblasti svetelného spektra. Funkciou chlorofylu *b* je prenos svetelnej energie na hlavný fotosyntetický pigment – chlorofyl *a*. Iba chlorofyl *a* sa priamo podieľa na premene svetelnej energie na energiu chemických väzieb, a aj to len v prípade, ak sa nachádza priamo



v reakčnom centre fotosyntézy. V prípade, že sa vyskytuje mimo týchto centier, je súčasťou svetlozberného systému spolu s chlorofylom *b* a karotenoidmi.

1.3 Fotosytémy

Asimilačné pigmenty spolu s bielkovinami, na ktoré sú naviazané, a redoxnými systémami prenášajúcimi elektróny vytvárajú základnú štruktúrnú a funkčnú jednotku, nazývanú fotosystém.

Ako bolo spomenuté vyššie, podľa vlnovej dĺžky, v ktorej prebieha absorpcia svetelného žiarenia, rozlišujeme 2 typy chlorofylu *a* P 700 a P 680, a podľa nich rozlišujeme dva fotosystémy. Fotosystém PS 1 obsahuje ako základ pigmentového systému chlorofyl *a* P 700, fotosystém PS 2 chlorofyl *a* P 680. Tieto dva systémy sú aj priestorovo oddelené: PS 1 sa nachádza na membráne strómy, PS 2 na membránach grán. Fotosystémy sú navzájom prepojené, ale ich funkcie vo fotosyntéze sú odlišné. PS II štiepi vodu a je spojený so syntézou ATP, zatiaľ čo len PS I prenáša elektróny na konečný akceptor elektrónov NADP⁺.

1.4 Elektrónový transport ako súčasť svetelnej fázy fotosyntézy

Zdrojom energie pre svetelnú časť fotosyntézy je v prírode slnečné žiarenie. Pigmenty, ktoré sa jej zúčastňujú, sú schopné absorbovať svetelné žiarenie v rozmedzí 400 – 700 nm, a tak sa dostávajú do vzbuđeného – excitovaného stavu. Tento úsek svetelného spektra sa nazýva aj fotosynteticky aktívna radiácia. Molekuly chlorofylu sú v normálnych podmienkach v stave, ktorý nazývame singlet. Po ožiarení, teda absorpcii svetelného žiarenia, sa dostanú do stavu excitácie, z ktorého sa do pôvodného stavu vedia dostať vyžarovaním svetla, vyžarovaním tepla alebo vnútornou konverziou. Absorbovaná svetelná energia sa využije vo fotosyntéze len v prípade, keď excitované molekuly chlorofylu vstúpia do chemickej reakcie, a to tak, že v jeho blízkosti sa nachádza elektrónakceptor, ktorému molekula chlorofylu odovzdá elektrón, a namiesto tohto odovzdaného elektrónu prijme elektrón, ktorý mu poskytne elektrónodonor, tiež nachádzajúci sa v jeho blízkosti.

Táto reakcia prebieha v reakčných centrách, fotosyntetické pigmenty nachádzajúce sa v ich okolí sú súčasťou svetlozberného systému. Tieto molekuly po absorpcii žiarenia a prechode do ich excitovaného stavu nepremenia energiu na fotochemickú reakciu, ale odovzdávajú ju molekulám v nižšom energetickom stave nachádzajúcim sa v ich blízkosti. Takto sa dostanú späť do pôvodného stavu a vedľajšie molekuly sa po prijatí takejto energie excitujú. Takto prebieha tzv. transfer energie, ktorý sa uskutočňuje ako medzi molekulami



rovnakého pigmentu, tak aj v prípade rozdielnych typov pigmentu. Táto energia sa nakoniec dostáva k fotosenzibilnému chlorofylu v reakčnom centre.

V prípade vyšších rastlín rozlišujeme dva fotosystémy – PS 1 a PS 2 s rozdielnym typom chlorofylu *a* v základe reakčného centra. K reakčným centráм fotosyntetických systémov sa pripája elektróntransportný reťazec. V tomto komplexe prebieha séria oxidoredukčných reakcií. Po excitácii molekuly chlorofylu *a* nastáva v centrách prerozdelenie nábojov. Primárny akceptor elektrónu sa redukuje a chlorofyl je oxidovaný. Redukcia tejto oxidovanej molekuly pigmentu nastane po prijatí elektrónu od elektrónodora. Cez súčasti elektróntransportného reťazca sa elektróny pohybujú v smere redoxného potenciálu.

Vo fotosystéme PS 2 sa po ožiarení a prerozdelení náboja elektrón dostáva na feofytín – primárny akceptor – a postupne cez ďalšie akceptory až na plastochinón Qa. Ten je prepojený s cytochrómom b6/f, ktorý prenáša elektrón z PS 2 na PS 1. Dochádza k rozkladu molekuly H₂O za uvoľnenia molekuly O₂ a elektrónu, ktorým sa redukuje oxidovaná molekula chlorofylu *a* P 680; teda voda je donorom elektrónu. Na vytvorenie jednej molekuly O₂ sa spotrebujú dve molekuly H₂O, z nich sa získajú 4 elektróny, ktoré sa presúvajú cez plastochinón acytochróm a takto tvoria protónový gradient využívaný v tvorbe ATP.

Fotosystém PS 1 je významný pre cyklický aj pre necyklický transport elektrónov. Cyklický transport elektrónov, inak nazývaný aj cyklická fosforylácia, prebieha len v PS1. Po ožiarení a separácii náboja v molekule chlorofylu *a* 700 sa elektróny z excitovanej molekuly dostávajú na ferredoxín a cez plastochinón a cytochróm späť do reakčného centra, čím sa tvorí protónový gradient.

Necyklický transport elektrónov, alebo necyklická fosforylácia, zahŕňa transport elektrónov z rozkladu molekuly vody cez PS 2 a PS 1, ktoré sa dostávajú až na molekulu koenzýmu NADP⁺, pričom jeho redukciou vzniká NADPH+H⁺ a ATP.

Pôsobením svetelného žiarenia na fotosynteticky aktívne pigmenty v rastlinách sa svetelná energia premieňa na energiu chemických väzieb. Z elektrónodora, ktorým sú 2 molekuly H₂O, získame molekulu O₂, redukovanú formu koenzýmu NADPH+H⁺ a ATP, ktoré rastliny využívajú k fotosyntetickej redukcii CO₂ počas tmavej fázy fotosyntézy.



2 Izolácia chloroplastov

2.1 Použité chemikálie:

- 2-amino-2-hydroxymetyl-propán-1,3-diol (TRIS)
- chlorid sodný
- hexahydrát chloridu horečnatého
- sacharóza
- acetón
- kyselina chlorovodíková, 36%
- destilovaná voda

2.2 Príprava izolačného média – TRIS pufor

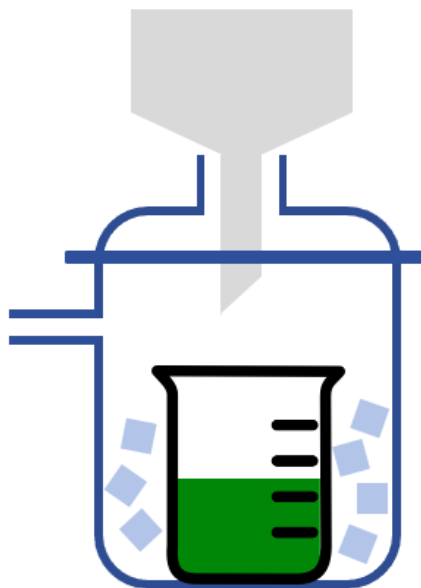
Pred izoláciou chloroplastov je treba pripraviť izolačné médium, tzv. TRIS tlmivý roztok s pH 7,2. V 1 litry destilovanej vody rozpustíte 2,42 g 2-amino-2-hydroxymetyl-propán-1,3-diolu, 4,1 g hexahydrátu chloridu horečnatého, 0,87 g chloridu sodného a 68,45 g sacharózy. Pomocou pH metra upravte hodnotu pH na 7,2 pridaním 36 % HCl. Pufor je následne potrebné skladovať v chladničke.

Tabuľka 1. TRIS tlmivý roztok.

Zložka pufra	Množstvo
H ₂ O	1l
TRIS Tris(hydroxymetyl)aminoetán	2,42g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4,1g
NaCl	0,87g
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Sacharóza)	136,9g

2.3 Spracovanie listov špenátu

Na izoláciu chloroplastov použite listy špenátu siateho (*Spinacia oleracea* L.). Z čerstvých listov špenátu oddelíte stredovú stonku a pokrájajte ich na menšie časti. K takto pripraveným 80g listom pridajte 200 ml TRIS pufru a mixujte 2×30 sekúnd v mixéri. Počas mixovania je možné mixér dodatočne chladieť pomocou mikroténových vrecúšok s ľadom. Zmes je nutné v každom kroku chladieť, pretože pri vyšších teplotách by mohli chloroplasty stratiť funkciu. Vzniknutú zmes prefiltrujte za zníženého tlaku. Aparatúra sa skladá z Büchnerovho lievika s pridanou filtračnou prepážkou z vrstiev nylonovej tkaniny pokrytých rovnomerne navlhčenou vrstvou vaty, odsávacej banky, do ktorej je vložená malá kadička ako zberná nádoba na chloroplastový filtrát. Priestor medzi stenami odsávacej banky a kadičky vyplňte ľadovou drvinou (viď obrázok 2).



Obrázok 1: Filtračná aparatúra

Chloroplasty obsiahnuté vo filtráte ďalej oddelíte v centrifúge.



2.4 Centrifugácia filtrátu

Naplňte centrifugačné kyvety filtrátom s chloroplastami a vyvážite ich na rovnakú hmotnosť. Na úpravu hmotnosti môžete použiť zvyšný TRIS pufor.

Fáza centrifugácie:

1. 5 minút, 50 RCF, s následným oddelením sedimentu s hrubými nečistotami od supernatantu s chloroplastami;
2. 20 minút, 5000 RCF, s následným odliatím supernatantu a oddelením sedimentovaných chloroplastov.

Po druhej centrifugácii k sedimentu obsahujúcemu chloroplasty pridajte minimálne množstvo TRIS pufru do konzistencie vhodnej na miešanie a naberanie mikropipetou. Centrifugáciou získané chloroplasty uchovávajte v liekovkách v hlbokomraziacom boxe.

2.5 Stanovenie množstva chlorofylu

50 µl pripravenej suspenzie s chloroplastami pipetou preneste do 10 ml odmernej banky a doplňte 80 % roztokom acetónu. Takto pripravenú zmes prefiltrujte cez filtračný papier a pri vlnovej dĺžke 625 nm pomocou UV/Vis spektrofotometra zmerajte absorbanciu (A_{652}) proti slepej vzorke – 80 % roztoku acetónu.

Množstvo chlorofylu zistíte z nasledovného vzťahu:

$$n = 5,8 \times A_{652} \text{ [mg/l]}$$

Zistené množstvo chlorofylu použite na výpočet objemu izolovaných chloroplastov potrebného na prípravu základnej suspenzie chloroplastov v izolačnom médiu TRIS (ďalej len základná suspenzia), ktorá sa používa pri príprave roztokov v ďalších spektrofotometrických meraniach. Na výpočet objemu chloroplastov primiešaných do 10 ml izolačného média TRIS použite vzťah:

$$V = \frac{300}{1,6 \times n} \text{ µl/10ml}$$

3 Stanovenie inhibície elektrónového transportu v chloroplastoch

3.1 Stanovenie aktivity chloroplastov

Aktivita chloroplastov bez pridanej zlúčeniny, ktorá spôsobuje inhibíciu fotosyntetického elektrónového transportu (PET), je potrebná pre zistenie inhibičnej koncentrácie IC_{50} jednotlivých zlúčenín. Táto koncentrácia zlúčeniny spôsobí pokles aktivity chloroplastov o polovicu a je mierou ich herbicídnej aktivity.

Ako elektrónakceptor použite roztok farbiva 2,6-dichlórfenolindofenolu (DCPIP) s koncentráciou 40 $\mu\text{mol/l}$, ktorého pokles absorbancie je mierou elektrónového transportu. Vyhodnotenie vykonajte spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 600 nm s nasledovným zložením roztokov (tabuľka 2).

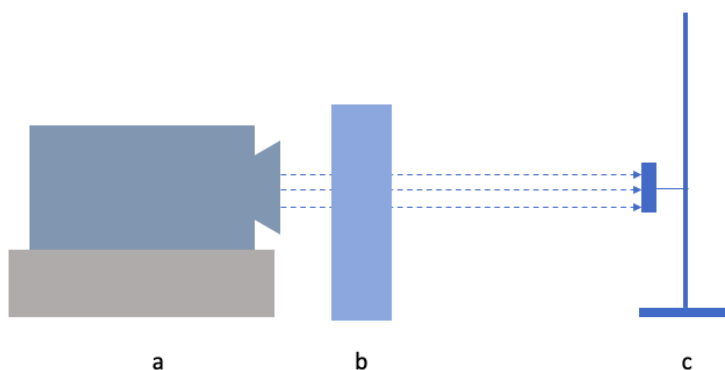
Tabuľka 2: Zloženie roztokov pre spektrofotometrické stanovenie aktivity chloroplastov.

vzorka s farbivom	slepá vzorka (blank)
1800 μl základná suspenzia	1800 μl základná suspenzia
100 μl DCPIP	200 μl TRIS pufor
100 μl TRIS pufor	



Obrázok 2: Roztok chloroplastov a roztok DCPIP.

Po zmeraní absorbie vzorku ožiarte svetlom z halogénovej žiarovky (250 W) z 10 cm vzdialenosti a so 4cm vrstvou vodného filtra ako ochrannou bariérou proti zahriatiu vzorky (viď obrázok 4). Nasledovne opäť zmerajte absorbiáciu vzorky. Pokles tejto hodnoty je mierou aktivity čistých chloroplastov, t.j. bez pridanej zlúčeniny spôsobujúcej inhibíciu PET.



Obrázok 3: Aparatúra na ožarovanie kyvety so vzorkou (a = zdroj svetla, b = vodný filter, c = stojan s kyvetou so vzorkou).

3.2 Stanovenie inhibície elektrónového transportu v chloroplastoch

V rámci tohto stanovenia sa postupuje rovnakým spôsobom ako pri stanovení aktivity chloroplastov. Ako blank pri meraní taktiež použite roztok s rovnakým zložením (1800 µl základná suspenzia, 200 µl TRIS pufor).

Ďalej pripravte základný roztok testovanej látky s koncentráciou 0,01 mol/l rozpustením v dimetylsulfoxide (DMSO), ktorý v použitom množstve neovplyvní aktivitu chloroplastov. Zlúčeninu vo forme takéhoto roztoku potom pridávajú do meraných vzoriek podľa tabuľky č. 3. Ďalšie riedenie zlúčeniny sa použije len v prípade, keď pre vysokú aktivitu látky nie je uvedené riedenie dostatočné.



Tabuľka 3: Zloženie roztokov s testovanou látkou pre spektrofotometrické stanovenie inhibície elektrónového transportu v chloroplastoch.

Riedenie č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Základná suspenzia [μl]	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800
DCPIP roztok [μl]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Roztok testovanej látky [μl]	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
TRIS pufoer [μl]	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90

Inhibícia PET testovanými zlúčeninami sa prejaví ako pokles aktivity neinhibovaných chloroplastov. Miera inhibičnej aktivity na elektrónový transport v chloroplastoch špenátu je pre testované zlúčeniny vyjadrená ako IC_{50} , čo je koncentrácia zlúčeniny, pri ktorej poklesne aktivita chloroplastov na polovicu. Pre výpočet IC_{50} postupujte nasledovne:

Aktivita čistých chloroplastov je daná vzťahom:

$$X_c = A_{c1} - A_{c2}$$

kde X_c označuje aktivitu čistých chloroplastov, A_{c1} absorbanciu vzorky čistých chloroplastov pred ožiarením a A_{c2} absorbanciu vzorky čistých chloroplastov po ožiarení. Pre ďalšie výpočty sa stanoví hodnota $X_{c1/2}$ ako polovica hodnoty X_c :

$$X_{c1/2} = IC_{50} = \frac{X_c}{2}$$

Aktivitu chloroplastov po pridaní testovanej zlúčeniny zistíte zo vzťahu:

$$X = A_1 - A_2$$

kde X označuje aktivitu chloroplastov po pridaní testovanej látky, A_1 absorbanciu vzorky s testovanou zlúčeninou pred ožiarením a A_2 absorbanciu vzorky s testovanou zlúčeninou po ožiarení.

Optické metódy chemickej analýzy

Katedra analytickej chémie

Prírodovedecká fakulta, Univerzity Komenského v Bratislave



Na základe nameraných hodnôt X zistíte koncentráciu, ktorá prislúcha hodnote $X_{C1/2} = IC_{50}$.



3.3 Vyhodnotenie výsledkov

1. Z nameraných hodnôt A_{c1} a A_{c2} stanovte aktivitu neinhibovaných chloroplastov X_c .

$$X_c = A_{c1} - A_{c2}$$

2. Zmerajte absorbanciu A_1 vzorky s testovanou zlúčeninou pred ožiarením a absorbanciu A_2 vzorky s testovanou zlúčeninou po ožiarení. Výsledky zapíšte do tabuľky a vypočítajte hodnotu X (aktivitu chloroplastov po pridaní testovanej zlúčeniny).

Riedenie č.	A_1	A_2	$X (A_1 - A_2)$
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

3. Zo získaných hodnôt X vyberte tú, ktorá sa svojou hodnotou rovná $X_{c1/2}$. V prípade, že aj pri riedení č. 10 je hodnota X vyššia ako $X_{c1/2}$, je nutné vzorku testovanej látky ďalej riediť.



4 Referencie

GARRETT, Reginald H. *Biochemistry*. Belmont, Ca: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2010. ISBN 9780495109358.

ZIMA, M. *Fyziológia rastlín*. Nitra : Slovenská Poľnohospodárska Univerzita, 2002, ISBN 80-8069-011-1

Chloroplasts - Structure And Functions | A-Level Biology Revision Notes. In: *A Level Biology* [online]. 2018 [cit. 05.03.2022]. Dostupné na internete: <https://alevelbiology.co.uk/notes/chloroplasts-structure->

TAIZ, Lincoln, ZEIGER, Eduardo. *Plant physiology*. [s.l.]: Sunderland Sinauer Associates, 2002. ISBN 9780878938568.

BARBER, James. Photosystem II: the engine of life. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* [online]. 2003, vol. 36, no. 1, s. 71-89 [cit. 04.10.2021]. DOI: 10.1017/S0033583502003839

GONEC, Tomas et al. Halogenated 1-Hydroxynaphthalene-2-Carboxanilides Affecting Photosynthetic Electron Transport in Photosystem II. In: *Molecules* [online]. 2017, vol. 22, no. 10, s. 1709 [cit. 05.03.2022]. DOI: 10.3390/molecules22101709

COE, Jesse et al. Crystallization of Photosystem II for Time-Resolved Structural Studies Using an X-ray Free Electron Laser. In: *Methods in Enzymology* [online]. 2015, vol. 557, s. 459-482 [cit. 05.03.2022]. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.01.011

ALBERTS, Bruce. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland, 2002. ISBN 9780815332183.

FROMME, Petra, JORDAN, Patrick, KRAUSS, Norbert. Structure of photosystem I. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2001, vol. 1507, no. 1, s. 5-31. DOI: 10.1016/S0005-2728(01)00195-5

LODISH, Harvey et al. Molecular Analysis of Photosystems. In: *Molecular Cell Biology*. 4th edition [online]. 2000 [cit. 05.03.2022]. Dostupné na internete: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21484>