

# **Az antioxidánsok és a poli(ADP-ribóz) polimeráz szerepe a gabonafélék abiotikus stresszek által indukált öregedésében**

## **Részletes jelentés**

### *1. Bevezetés*

A kedvezőtlen környezeti hatások, illetve az általuk előidézett korai öregedési folyamatok jelentős termés kiesést idéznek elő fontos gazdasági növényeinknél. A stressz körülmények közt bekövetkező biokémiai és élettani folyamatok megismerése nemcsak elméleti, hanem gyakorlati szempontból is fontos. A stressztűréssel kapcsolatos szabályozó folyamatok és anyagcsere-utak vegyszeres vagy genetikai manipulálásával lehetővé válik a növények ellenállóképességének növelése, és így a terméshozam nagyobb lehet kedvezőtlenebb környezeti körülmények közt is.

### *2. Kísérleti cél*

Kísérleteinknek az volt a célja, hogy tanulmányozzuk a különböző antioxidánsok (kataláz, aszorbát peroxidáz, glutation reduktáz, glutation, aszorbinsav) és a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerepét az abiotikus stresszek által előidézett öregedési folyamatokban. A két kiválasztott paraméter közti kapcsolatot az jelenti, hogy a környezeti stressz hatására és az öregedési folyamatok során felhalmozódó szabad gyökök aktiválják az antioxidánsokat és közvetve (a DNS molekulák feldarabolódásának előidézése révén) a PARP enzimet is. A PARP enzim poli(ADP-ribóz)-oldalláncokat kapcsol a fehérjékhez NAD-ot felhasználva, így a sejt energiaraktárának kimerítése miatt idézhet elő sejthalált. Az antioxidánsok a szabad gyökök eltávolítása révén, közvetve csökkentik a PARP aktivitását, és így a stressz- és az öregedési folyamatok folyamán fellépő károsodásokat is.

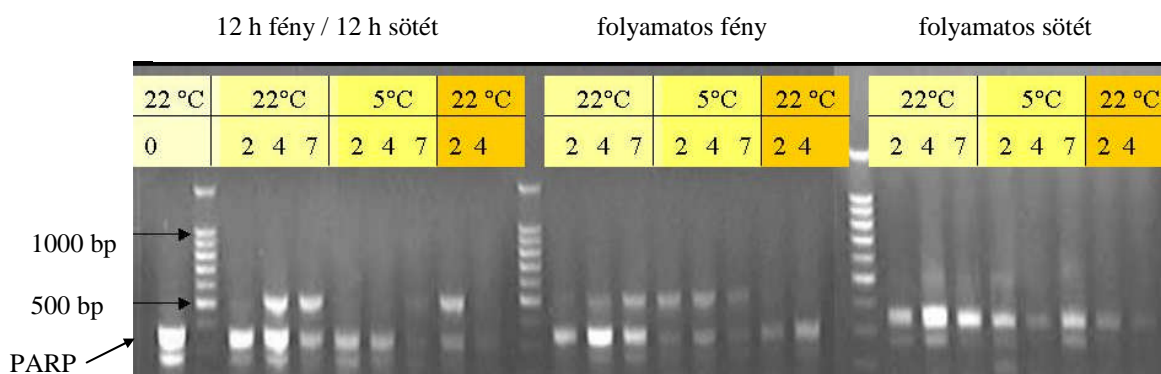
### *3. Eredmények*

#### *3.1. A sötétben történő nevelés által indukált öregedés hatása az antioxidánsokra és a PARP-ra*

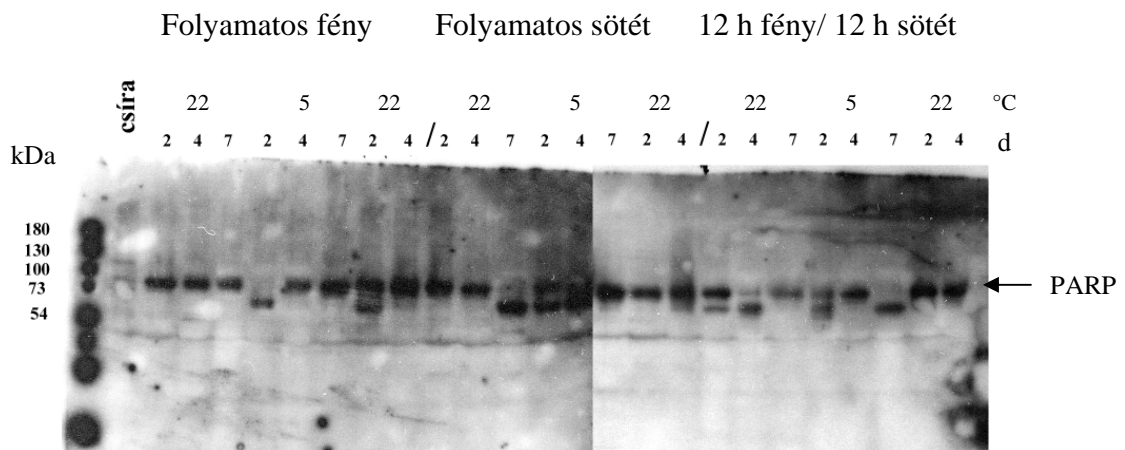
Három antioxidáns enzim, a glutation reduktáz (GR), az aszorbát peroxidáz (AP) és a kataláz (Kat) aktivitását olyan kukoricanövényekben hasonlítottuk össze, melyeket csírázás után 9 napig folyamatos fényben, folyamatos sötétben vagy 12 h megvilágítás mellett neveltünk. A folyamatos fényben tartott növényekben a GR friss tömegre vonatkoztatott aktivitása kétszer magasabb volt a másik két csoporthoz képest. A Kat aktivitása a folyamatosan sötétben tartott növényekben fele volt a 12 vagy 24 órán át megvilágított növényekben mért értéknek. Az alacsony Kat-aktivitás egyik jele lehet a fényhiány által elindított öregedési folyamatoknak. Az AP aktivitása mindhárom

csoportban hasonló volt. A kísérlet folytatásaként a különböző ideig megvilágított növényeket 5 °C-on neveltük tovább. A folyamatos fényben nevelt növényekben 2 nap 5 °C-os kezelés következtében a GR és az AP aktivitása duplájára nőtt, a Kat-é pedig felére csökkent. A folyamatos sötétben tartott növényekben a 7 nap hidegkezelés után kétszeresére emelkedett a GR friss tömegre vonatkoztatott aktivitása, míg a többi enzimé nem változott jelentősen. A 12 h megvilágítás mellett hidegkezelt növényekben csupán a Kat aktivitása csökkent a kezelés végére, míg a másik két enzim aktivitása változatlan maradt.

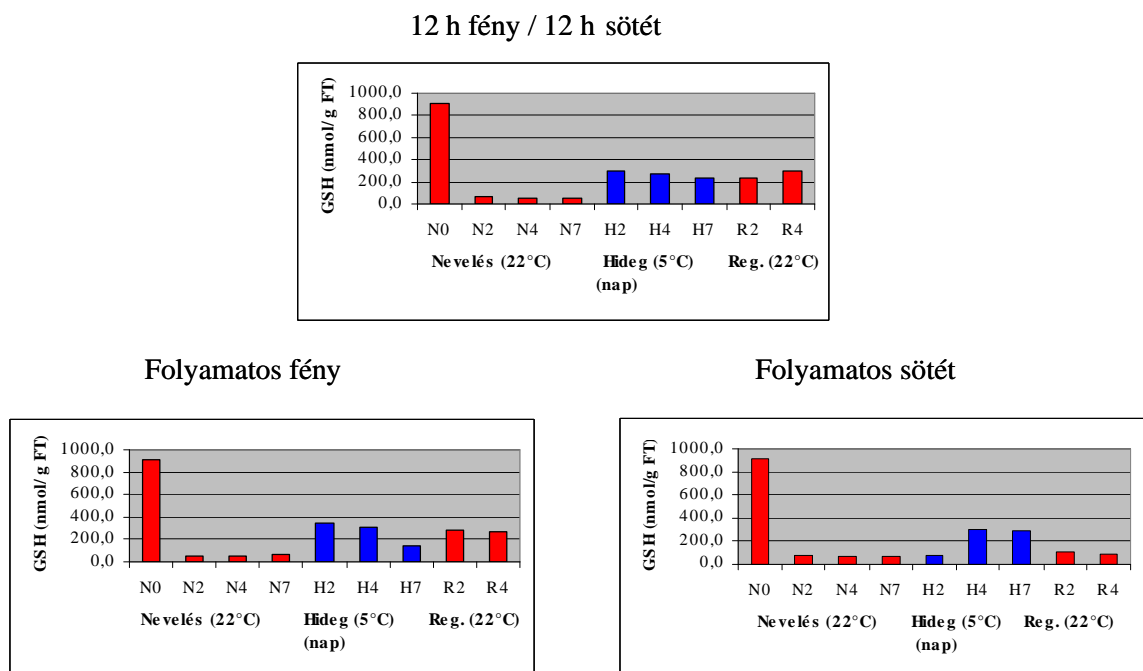
A különböző megvilágítási viszonyoknak a glutation és a PARP szintjére kiváltott hatását is vizsgáltuk optimális és szuperoptimális hőmérsékleten a trópusi eredetű hidegérzékeny Penjalinan kukoricagenotípusban. Normál hőmérsékleten a PARP gén nagy mértékben fejeződött ki (RT-PCR, 1. ábra), a PARP fehérje (Western analízis, 2. ábra) többnyire intakt maradt (kivéve a 12 h fény /12 h sötét), a glutation (GSH, 3. ábra) és előanyagai (cisztein,  $\gamma$ -glutamilcisztein) redukált formáinak mennyisége, a redukált és az oxidált formák aránya kicsi, az oxidált formák szintje (HPLC) magas volt a megvilágítástól függetlenül a kísérlet kezdetén a csírában mért értékhez képest. Hidegkezelés következtében a génextpresszió a sötétben tartott növények kivételével gyengült, a PARP fehérje már 2 nap után degradálódott, bár egyes esetekben a hidegkezelés későbbi szakaszában ismét detektáltunk intakt fehérjét. A hidegkezelés következtében nagy lett a redukált tiolok mennyisége és a redukált és az oxidált formák aránya a megvilágítástól függetlenül. A hideget követő regeneráció során nem vagy csak gyengén fejeződött ki a PARP gén, a PARP fehérjét az összes megvilágítási viszony mellett ki lehetett mutatni, a tiolok szintje a sötétben nevelt növények kivételével a hidegkezelés során mért értékekhez hasonló volt. Az eredményekből megállapítható, hogy a magas PARP-szint többnyire kis GSH-tartalommal, míg az alacsony PARP-szint nagy GSH-tartalommal párosul. Ennek oka az lehet, hogy a GSH részt vesz a PARP-ot aktiváló reaktív oxigénformák eltávolításában.



1. ábra. A megvilágítás és a hidegkezelés hatása a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) expressziójára kukoricában. A PARP mRNS-nek a 320 bp-os, nyíllal jelzett termék felel meg. A nagyobb termék pre-mRNS-nek, a kisebb pedig az mRNS bomlástermékének felelhet meg.



2. ábra. A megvilágítás és a hidegkezelés és a hatása a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) fehérje mennyiségére kukoricában. A PARP-nak a 80 kDa-os, nyíllal jelzett fehérje felel meg. A kisebb fehérje a PARP bomlásterméke.



3. ábra. A megvilágítás hidegkezelés és a hatása a redukált glutation (GSH) mennyiségére.

A megvilágítás hatását vizsgáló kísérletek folytatásaként összehasonlítottuk az antioxidánsok és a PARP szintjét a már korábban tanulmányozott hidegérzékeny Penjalinan és a hidegtűrő Z7 kukoricavonalakban. A Penjalinanban kisebb mértékben csökkent a folyamatos sötét hatására a glutation és előanyagai redukált formáinak szintje és a redukált valamint az oxidált formák aránya a mérsékelt övi, hosszú nappalos Z7-hez képest. Az oxidált tiolok esetében, a redukáltaktól eltérően, csak kis mértékű változást idézett elő a megvilágítás megvonása. Folyamatos fény hatására a redukált tiolok szintje és a redukált/oxidált arány nagyobb lett a normál megvilágításhoz képest.

A sötétben történő nevelés következtében a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) génjének kifejeződésében bekövetkező változások nyomán követésével is próbálkoztunk, de csak lúdfűből volt elérhető a gén szekvenciája, és a tervezett primerpár kukoricában nem működött. Ezt az enzimet azért kívántuk tanulmányozni, mivel a PARP által a fehérjékhez kapcsolt poli(ADP-ribóz) polimerek eltávolítását végzi. A PARP enzimet hasító kaszpázok növényi megfelelőjét is próbáltuk kimutatni az állati rendszerekben használt antitesttel, de eddigi próbálkozásaink eredménytelenek voltak. Fényfüggési kísérleteinket búzára is szeretnénk volna kiterjeszteni, de a kukoricára tervezett PARP primerpár a szekvencia-homológia ellenére nem működött búzában.

### *3.2. A különböző abiotikus stresszek hatása az antioxidánsok és a szabad gyökök mennyiségére*

Kukoricában vizsgáltuk a különböző abiotikus stresszhatásoknak a redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation mennyiségére és a két forma arányára kifejtett hatását (Kocsy és mtsai., 2004a). Hő hatására nagymértékben nőtt a GSH/GSSG arány a hidegérzékeny Penjalinanban, míg a hidegtűrő Z7-ben nem változott. Ozmotikus stressz következtében a GSH/GSSG arány csak a Penjalinanban emelkedett.

E kísérletekben mértük egy másik, a sejt redox állapotának szabályozásában résztvevő molekula, a tioredoxin h mennyiségének (Western analízis) abiotikus stresszhatások által előidézett változásait is (Kocsy és mtsai., 2004a). A GSH-hoz hasonlóan, a hidegtűrő genotípusban alacsony, a hidegérzékenyben magas hőmérsékleten volt nagyobb a tioredoxin h mennyisége.

Mivel a kukorica nevelési igényei a szójához hasonlóak és a kukoricás kísérletünk a fitotronban rendelkezésre álló legkisebb növénynevelő kamrát is csak félig foglalta el, a szárazságtűrési kísérletekbe a szóját is bevontuk. A stressztűrésben fontos szerepet játszó prolint csökkent, illetve magasabb koncentrációban termelő transzformáns szójavonalakban megállapítottuk, hogy a prolinszint genetikai manipulálása hatással van az általunk tanulmányozott antioxidánsok közül a glutation és az aszkorbinsav koncentrációjára, valamint a reaktív oxigénformák közül a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a lipid-peroxidok szintjére (Kocsy és mtsai., 2005).

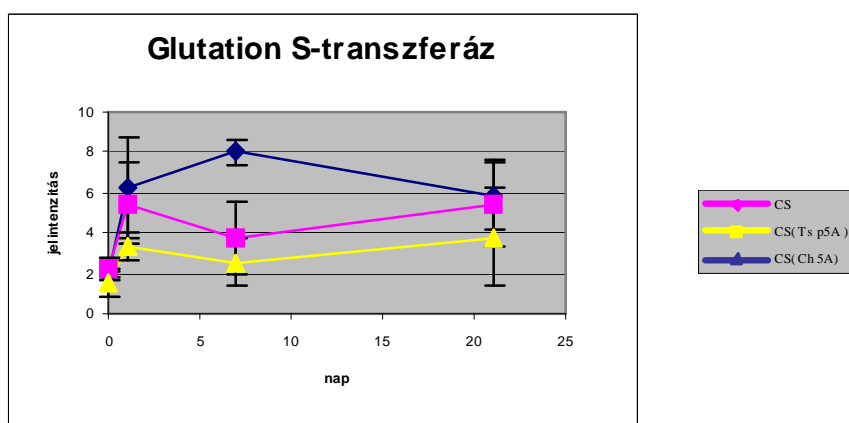
### 3.3. A búza 5A kromoszómájának szerepe az antioxidánsok szintjének szabályozásában

A búza 5A kromoszómája számos, a stressztűrésben fontos szerepet játszó vegyület felhalmozódására hatással van. Különböző stressztűrésű búza genotípusokból előállított 5A kromoszóma szubsztitúciós vonalakat felhasználva sikerült kimutatni, hogy a búza 5A kromoszómája nem csupán a hidegkezelés által előidézett, hanem a hő- és az ozmotikus stressz következtében fellépő GSH-szintváltozásra is hatással van (Kocsy és mtsai., 2004 b és 2004c).

Búza 5A kromoszóma deléciós vonalak segítségével próbáltuk meghatározni az abiotikus stresszek által indukált GSH-felhalmozódásért felelős gén kromoszómán belüli helyét. A legkisebb deléciót tartalmazó 15-ös vonalban az alacsony hőmérsékleten kivitelezett ozmotikus stressz következtében alacsonyabb volt GSH szintje és a GSH/GSSG arány a másik két vonalhoz képest. Ez a jelenség úgy magyarázható, hogy a kromoszóma hiányzó végén olyan gén van, mely hatással van egy, a megmaradó részen elhelyezkedő, a GSH-szintézist befolyásoló génre.

Az 5A kromoszómára rekombináns búzavonalakban az antioxidánsok stressz által előidézett koncentrációváltozásait összehasonlítva megállapítottuk azt, hogy a kromoszóma mely régiói felelősek a glutation S-transzferáz és a kataláz aktivitásának, valamint a glutation mennyiségének ozmotikus stressz és hidegkezelés hatására bekövetkező változásáért (Soltész és mtsai., 2005).

Eltérő fagyűrűsű 5A kromoszóma szubsztitúciós vonalak hideg által előidézett transzkripciós mintázat változásait cDNS-macroarray-jel összehasonlítva sikerült megállapítanunk, hogy az antioxidánsok közül a glutation S-transzferáz génjének expressziójára van hatással ez a kromoszóma. Az expresszió növekedése a hidegkezelés következtében nagyobb volt a fagyűrű CS(Ch5A) szubsztitúcióban a CS(Tsp5A)-hoz képest (4. ábra). Az eredményeket Northern-analízissel is alátámasztottuk.



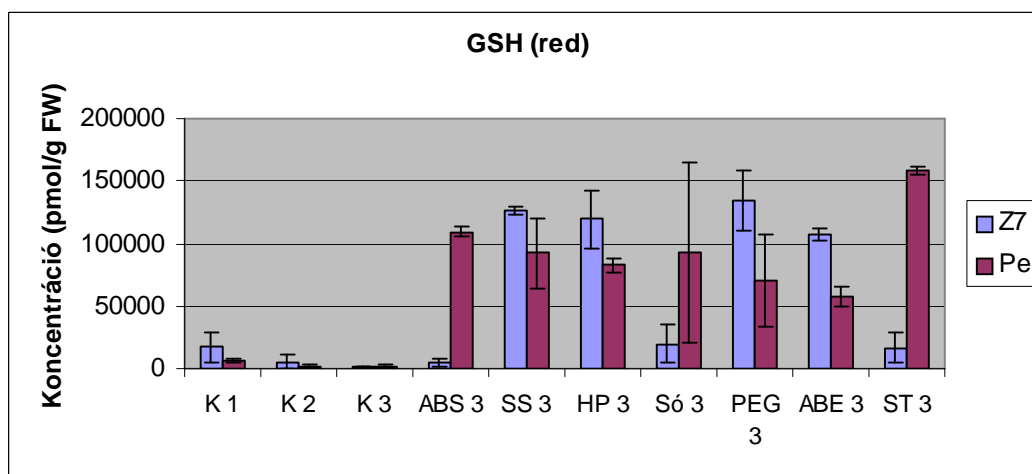
4. ábra. A hidegkezelés hatása a glutation S-transzferáz génjének expressziójára búzában. CS: mérsékeltén fagyérzékeny recipiens, CS(Tsp5A): fagyérzékeny 5A szubsztitúciós vonal, CS(Ch5A): fagyűrő 5A szubsztitúciós vonal.

### 3.4. A különböző vegyszeres kezelések hatása a glutation és a PARP mennyiségére

A GSH-szintézist butionin-szulfoximinnel fokozatosan gátolva csökkenteni tudtuk a GSH mennyiségét és a kukorica növények stressztűrését. A PARP-ot különböző koncentrációjú aminobenzamiddal gátoltuk a leghatékonyabb koncentráció kiválasztása céljából.

Vizsgáltuk a különböző vegyszeres kezelések hatását a PARP-ra és az antioxidánsokra kukoricában. A PARP-ot gátló aminobenzamid átmenetileg csökkentette a tiolok mennyiségét is, a glutationszintézist gátló butionin-szulfoximint alkalmazva pedig a PARP fehérje mennyisége is kisebb lett. Az alkalmazott növényi szabályozóanyagok közül a szalicilsav csökkentette a glutation és a PARP fehérje szintjét, míg az abszcizinsav nem befolyásolta lényegesen a két vegyület koncentrációját.

A hidegtűrő Z7 és a hidegérzékeny Penjalinan kukoricavonalakat különböző vegyszerekkel kezelve a redukált glutation koncentrációjának jelentős emelkedését tapasztaltuk (5. ábra). Az abszcizinsavas (növekedésszabályozó) és NaCl-os (ionos ozmotikum) kezelést és a folyamatos sötétben (korai öregedés) történő nevelést követően a Penjalinanban többszöröse volt a glutation koncentrációja a Z7-ben mért értéknek. A szalicilsav (növekedésszabályozó), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reaktív oxigénforma), polietilén-glikol (nem ionos ozmotikum), aminobenzamid (PARP-gátló) kezelés esetében a Z7-nél volt magasabb a glutation-tartalom.



5. ábra. Az egy hetes abszcizinsav (0,1 mM, ABS), szalicilsav (0,5 mM, SS), hidrogénperoxid (1 mM, HP), NaCl (200 mM, só), polietilén-glikol (15 %, PEG) és aminobenzamid (1 mM, ABE) kezelés és a folyamatos sötét hatása a redukált glutation mennyiségére a hidegtűrő Z7 és a hidegérzékeny Penjalinan (Pe)

kukoricagenotípusokban. K1, K2 és K3 – kontroll növények a kezelés kezdetén, 3 és 7 nap után.

#### 4. Következtetések

1. Összefüggést találtunk a glutation és a PARP szintjének szuboptimális hőmérsékletek által előidézett változása közt.
2. Abiotikus stresszek következtében a glutation szintje eltérően változik a hidegérzékeny és a hidegtűrő kukoricavonalban.
3. A búza 5A kromoszómája hatással van az antioxidánsok mennyiségének abiotikus stresszek által előidézett változására.
4. A különböző vegyszeres kezelések eltérő mértékben változtatják meg a glutation koncentrációját a hidegtűrő és a hidegérzékeny kukoricavonalban.

A kísérletek folytatásaként a vizsgált paraméterek stressz indukálta változásait több érzékeny és toleráns genotípusban kívánjuk összehasonlítani, hogy megállapíthassuk, alkalmasak-e a stressztűrő genotípusok kiválasztására.

#### 5. Az eredményekhez kapcsolódó fontosabb publikációk

- Kocsy G., Kobrehel K., Szalai G., Duviau M.-P., Buzás Z., Galiba G.:  
Thioredoxin *h* and glutathione as abiotic stress tolerance markers in maize.  
*Env. Exp. Bot.* 52: 101-112, 2004a (IF: 1,632).
- Kocsy G., Laurie R., Szalai G., Szilágyi V., Simon-Sarkadi L., Galiba G, de Ronde, JA: Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiol Plant*, 124: 227-235, 2005 (IF: 1,767).
- Kocsy G., Szalai G., Galiba G. Effect of osmotic stress on glutathione and hydroxymethylglutathione accumulation in wheat. *J. Plant Physiol.* 161: 785-794, 2004b (IF: 1,149).
- Kocsy G., Szalai G., Sutka J., Páldi E., Galiba G.: Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Science* 166, 451-458, 2004c (IF: 1,652).
- Soltész A., Kocsy G., Szalai G., Szilágyi V., Galiba G.: Comparison of the antioxidant capacity in cold-treated recombinant wheat lines. *Acta Biol. Szegediensis.* 49: 117-119, 2005.

