

## **Intracelluláris stresszválaszok növényekben és azok leképezése: a nitrogén-monoxid szerepe**

- 1. A nitrogén-monoxid (NO) szerepe a gyökér növekedésében és fejlődésében szárazság stressz alatt.**
- 2. A NO hatása a fotoszintézis regulációs elemeire**
- 3. Hatás – kölcsönhatás a nehézfémek és a NO között**

### **1. A nitrogén-monoxid (NO) szerepe a gyökér növekedésében és fejlődésében szárazság stressz alatt.**

A gyökérrendszer fejlődését a belső, főként hormonális és sejtciklus szabályozó faktorok (Malamy és Benfey, 1997) mellett környezeti faktorok is befolyásolják, melyek közül a legmarkánsabb hatású a víz stressz és a tápanyag ellátottság (Lynch 1995, Malamy és Ryan 2001, Malamy 2005). Ebben a tanulmányban egy környezeti faktor (ozmotikus stressz) és egy tipikus belső faktor (auxin) hatását vizsgáltuk a főgyökér megnyúlásra, a másodlagos (oldal-) gyökérfejlődésre és a nitrogén-monoxid (NO) jelmolekula keletkezésére.

Víz stressz során a gyökerek megnyúlása általában erősen gátolt, bár enyhe ozmotikus stressz képes stimulálni a növekedést (van der Weele és mts. 2000). Újabb vizsgálatok rámutattak, hogy a kulcs folyamat a növények környezeti hatásokra adott válasza során az oxidatív stressz és az auxin közötti kölcsönhatás, ami megváltozott auxin transzportot, így módosult növekedést és fejlődést eredményez (Pasternak és mts. 2005). A saját kísérleteinkben kapott eredményeink, nevezetesen a növekvő ozmotikus stresszre és külső auxinra adott gyökérfejlődési válaszok hasonlósága az előbbi elképzelést támasztják alá. Mindkét kezelés esetében, a főgyökér hosszának csökkenése elérte a kontroll kb. 50%-át és az oldalgökér szám növekedése ozmotikus stressz hatására pedig 180%-os, míg a legmagasabb indol-3-vaajsav (IBA) koncentrációnál kb. 280%-os volt. Az ozmotikus stressz és az auxin hatására kialakult gyökérfejlődési sajátosságbeli hasonlóságok ellenére, jelentős különbség volt a nitrogén-monoxid felszabadulás intenzitásában: míg a  $10^{-5}$  M IBA koncentrációval kezelt gyökerekben 3-szoros, az ozmotikus stressznek kitett gyökerekben 14-szeres NO szint növekedést mértünk a 400 mOsm-os polietilén glikol (PEG 6000) koncentrációnál (-0.98

MPa). A NO produkció intenzív növekedése kísérte az oldalgökök iniciációját mindkét esetben. A széles koncentrációtartományú exogén alkalmazott IBA lehetővé tette gyökernövekedésre- és fejlődésre irányuló kettős hatásának vizsgálatát: az IBA alacsony koncentrációi ( $10^{-9}$  M- $10^{-8}$  M) a főgyökér megnyúlásnak kedveztek, melyet nem követett NO felszabadulás, míg a magasabb IBA koncentrációk ( $10^{-7}$  M- $10^{-3}$  M) az oldalgökök fejlődésért és a NO keletkezésért voltak felelősek. Az oldalgökök szám emelkedése folyamatos volt, de a NO fluoreszcencia a  $10^{-5}$  M-os IBA kezelésnél mutatott maximumot. Az intenzív NO felszabadulás szorosan kapcsolódik az oldalgökök fejlődéséhez, mivel a NO fluoreszcencia csökkenését és a rövid primordiumok megnyúlását detektáltuk, miután a növényeket alacsony IBA koncentrációjú közegbe helyeztük át. A NO tartalom növekedett, és új primordiumok jelentek meg fordított kezelés esetén. A gyökeresedési folyamat és a NO felszabadulás időfüggésének vizsgálata során azt találtuk, hogy a  $10^{-5}$  M IBA oldalgökök számra és NO fluoreszcenciára gyakorolt hatása a kezelés 48. órája után jelentkezett. Az auxin-indukált NO szintézis és oldalgökök indukció hasonló időbeli alakulása arra enged következtetni, hogy ezen folyamatok között funkcionális kapcsolat van. Ezt a feltételezést alátámasztja az eredmény, hogy a NO fluoreszcencia szorosan kapcsolódik a gyökerek auxin szintjéhez. Az ozmotikus stressznek kitett és az IBA-kezelt gyökerekben a NO keletkezés időfüggése jelentős különbséget mutatott, mert az előbbi növénycsoportban az iniciálisok megjelenését egy tranziens NO felszabadulás („stressz-NO”) előzte meg. Az ozmotikus stressz által indukált NO felszabadulás e korai fázisa - mely a 24. órában tetőzik- világosan elkülöníthető az oldalgökök iniciációt kísérő NO fluoreszcenciától. A PEG-indukálta korai és késői NO felszabadulásokat borsó mellett *Arabidopsis* és búza növények gyökerében is megtaláltuk, ami a jelenség általános jellegére utal.

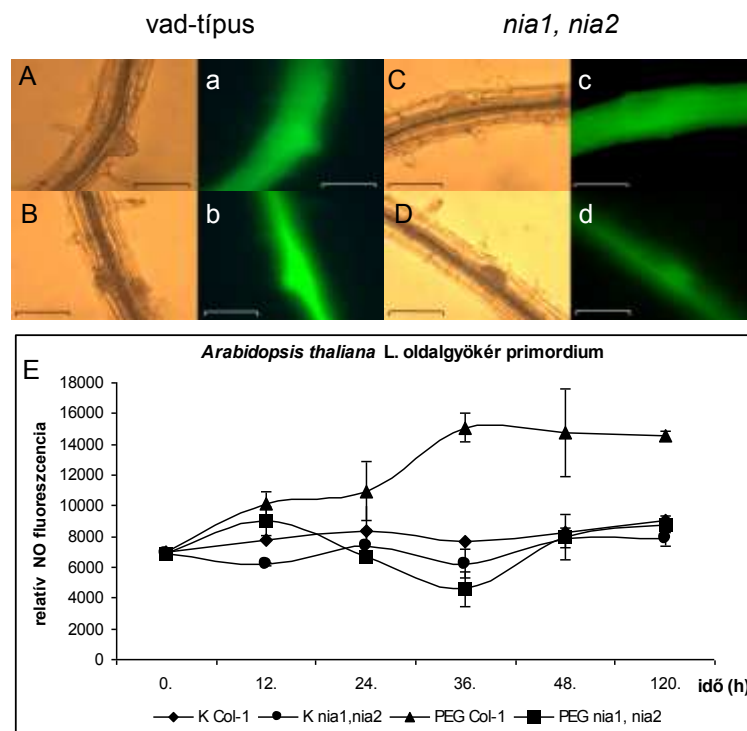
A korai NO tranziens és a későbbi, állandó NO- fázis forrása és szerepe valószínűleg különbözik. Ez utóbbi NO felszabadulás a kezeléseket 48. órája után indukálódott, mikor a tranziens már lecsökkent. A korai NO tranziens kinetikája a NO forrásának a függvénye lehet. Amikor az ozmotikus stressz indukált NO felszabadulást borsó gyökerekben a NO gyökfogó 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxiddal (cPTIO) elimináltuk, a kontrollhoz és az ozmotikus stressznek kitett gyökerekhez képest csökkent oldalgökök számot kaptunk, ami arra utal, hogy a korai NO tranziens („stressz-NO”) szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgökök fejlődéséhez. Ezen eredmények a NO különböző forrásaira és szignáltranszdukciós útban elfoglalt különböző lokalizációjára utalnak, ugyanis a NO a stressz válaszok korai lépéseiben szerepel, melyet a különböző útvonalak specifikációja előz meg.

A NO hatásának egyik lehetséges útja az oldalgökér fejlődés vezető szignalizációban az ún. S-nitroziációs reakció, így az alacsony redox potenciálú ditiotreitolt (DTT) alkalmaztuk az S-nitroziációs események gátlására, és az oldalgökér szám szignifikáns csökkenését kaptuk. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az auxin szignalizációban a NO S-nitroziációs reakciókban módosíthatja bizonyos enzimek vagy transzkripciós faktorok aktivitását.

Az indol-3-vaajsav számos növényfajban (pl. borsó, kukorica, dohány, lúdfű) természetesen előforduló auxin. Az irodalomban azonban ellentmondó eredmények vannak arra vonatkozólag, hogy az IBA indol-3-ecetsav (IAA)-on keresztül hat-e, avagy önálló auxin hatással rendelkezik. Ez a kérdés a saját kísérleti rendszerünkben is jelentőséggel bír, vagyis, hogy az oldalgökér (OGY) primordiumokban tapasztalt NO felhalmozódás az IBA közvetlen hatása-e. Ennek vizsgálatához a *pxal-1* mutáns *Arabidopsis* növényeket használtuk, melyekben az IBA nem képes átalakulni IAA-vá (Zolman és mts. 2000). A fent említett kontroll *pxal-1* mutáns gyökerek vad-típusnál magasabb NO tartalmát az okozhatja, hogy több IBA-t tartalmaznak (bár erre vonatkozó irodalmi adat jelenleg nem áll rendelkezésre), mivel ezekben nem történik meg annak átalakulása IAA-vá.  $10^{-5}$  M indol-3-vaajsavval történő kezelés a mutáns oldalgökér primordiumokban megnövelte a NO fluoreszcenciát a vad-típusú növényekhez hasonló mértékben, ami arra enged következtetni, hogy a NO szintézisét az IBA nem IAA-n keresztül, hanem közvetlenül indukálja.

Miután részleteket dolgoztunk ki a NO gyökérfejlődésben játszott szerepére vonatkozólag borsó növényben, a NO lehetséges enzimátikus forrásának mibenlétére kerestük a választ. Ezen kísérleteinkhez vad típusú (Col-1), nitrogén-oxid szintáz (NOS) mutáns *Atnoal* (Guo és mts. 2000) és nitrát reduktáz (NR) deficiens *nia1*, *nia2* (Wilkinson és Crawford, 1993) *Arabidopsis thaliana* L. növényeket használtuk fel. Eredményeink világosan rámutatnak, hogy az exogén alkalmazott IBA megnövelte a vad típusú, az *Atnoal* és a *nia1*, *nia2* mutáns növények oldalgökér sűrűségét, bár az előbbi két növénycsoportnál az IBA ~ 4-szeres OGY sűrűséget eredményezett, a NR-deficiens növényekben ez a hatás csupán 2-szeres volt. Vad-típusú gyökérben az IBA által indukált NO fluoreszcencia a primordiumok területére lokalizálódott, a főgyökérben kontroll szinten maradt. A NR szerepéről az IBA-indukált NO szintézisben az állati NOS enzim gátló  $N^G$ -monometil-L-arginin (L-NMMA) hatástalansága, valamint a NR enzim gátló wolframát kezelés NO szintet csökkentő hatása tanúskodott. Emellett az L-NMMA a főgyökerek alap NO szintjét nem befolyásolta, a wolframát viszont a kontroll gyökerek NO tartalmát is csökkentette. A mutánsok különböző NO szinteket mutattak a kontroll állapotukban (auxin kezelés nélkül). A *nia1*, *nia2* mutáns

esetében a másik két növénycsoportnál alacsonyabb NO fluoreszcenciát detektáltunk, ami NR-függő NO szintézis meglétére enged következtetni a gyökérben. Világosan bemutattuk, hogy az exogén IBA képes volt a NO felszabadulást indukálni a vad típusú és az *Atnoal* növényekben, de teljesen hatástalan volt a NR-deficiens mutánsban. Az ozmotikus stressz során bekövetkező NO képződésnek két szakaszát találtuk *Arabidopsis* gyökérben is, ezért külön kellett vizsgálnunk a korai („stressz-NO”) és a késői NO forrását. A NOS- inhibitor L-NMMA nem gátolta a NO szintézist az első 24 órában, viszont a *nia1*, *nia2* mutáns gyökereiben a PEG- indukálta korai „stressz-NO” megjelent (1. ábra). Ezekből arra következtethetünk, hogy a „stressz-NO” keletkezése független a NOS és a NR enzim aktivitásától. További kísérletünkből kiderült azonban, hogy a késői NO enzimatikus úton, NR enzim aktivitásához kapcsolatosan keletkezik, hiszen vad típusú és az *Atnoal* mutánsban az OGY sűrűség és a NO képződés fokozódott, míg a NR mutánsban a PEG kezelést nem követte sem OGY indukció, sem intenzív NO felszabadulás.



**1. ábra** Vad-típusú (Aa: 12 órás PEG kezelés Bb: 120 órás PEG kezelés) és *nia1*, *nia2* (Cc: 12 órás PEG kezelés, Dd: 120 órás PEG kezelés) mutáns *Arabidopsis* gyökerekről készült fény- (A-D) és fluoreszcens mikroszkópos (a-d) felvételek. A NO fluoreszcencia relatív értékei kontroll (vad típus ♦, *nia1*, *nia2* ●) és 400 mOsm PEG kezelt (vad típus ▲, *nia1*, *nia2* ■) gyökerekben.

## 2. A NO hatása a fotoszintézis regulációs elemeire

Biológiai rendszerekben a NO reagálni képes tiol- és vastartalmú fehérjékkel (Lamattina és mts. 2003). A fotoszintetikus és a mitokondriális elektron transzport lánc

bővelkedik átmeneti fémeket tartalmazó komplexben, emellett ismert, hogy a NO és a peroxinitrit gátolja a mitokondriális elektrontranszport láncot (Yamasaki és mts. 2001). Az exogén NO fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatása intakt levelekben kevésbé tanulmányozott. Ennek oka a kísérletekben használt, különböző mesterséges donorokban (is) keresendő, mivel különböző mennyiségű és redox-állapotú NO-t eredményeznek. Mellékhatásait tekintve a nátrium nitroprusszid (SNP) a legjelentősebb, mert a NO mellett cianid is felszabadul, így a kísérleti eredmények a NO szerepét illetően téves interpretációhoz vezethetnek. Ezért munkánk során több NO donor és gyökfogó molekulát teszteltünk intakt leveleken és azt tapasztaltuk, hogy az SNP által okozott változásokért részben a cianid a felelős. A további donorok közül a SNAP 2 óra inkubáció után alacsony NO szintet produkált, míg a S-nitrozoglutationról (GSNO) elmondható, hogy biológiai hatása a belőle felszabaduló NO-nak tulajdonítható. Ezen kísérletünk felhívja a figyelmet a donorok körültekintő megválasztásának szükségességére, emellett rámutat arra, hogy a GSNO hatékony donorként alkalmazható fotoszintézis vizsgálatokra *in vivo*. Eredményeink szerint a  $Q_A$  reoxidációs kinetikája azt mutatja, hogy a NO lassítja az elsődleges és másodlagos kinon elektron akceptorok közötti elektron transzfer lépést és gátolja a  $Q_A$  és a vízbontó enzim S2 állapota közötti töltésrekombinációt, valamint kölcsönhat a PS2 tirozin YD gyökkel is. Ezekkel az eredményekkel egybehangzóan a klorofill lassú fluoreszcencia indukció kinetikája arra utal, hogy a NO gátolja a fotokémiai és nem-fotokémiai kioltás lépéseit is. A NO ugyancsak módosítja a reakcióközponttal asszociált nem-fotokémiai kioltást. Bizonyítottuk, hogy az SNP által indukált változásokat részben a cianid okozza, ezért indokolt a kísérletekben többféle NO donor és gyökfogó használata. Összességében megállapíthatjuk, hogy a nitrogén-monoxid a fotoszintetikus elektron transzportlánc kulcsszabályozói közé tartozik.

### **3. Hatás – kölcsönhatás a nehézfémek és a NO között**

A NO szignálmolekulaként szerepel különböző abiotikus stressz válaszokban, mint például a nehézfém stressz. Néhány irodalmi adat rávilágít arra, hogy kapcsolat van a NO és a vas metabolizmus között.

Munkánk során vizsgáltuk különböző nehézfémek (kadmium, réz, cink) NO produkcióra gyakorolt hatását *Brassica juncea* L. és *Pisum sativum* L. és *Triticum aestivum* L. növényekben. Ahhoz, hogy a NO és a nehézfémek által indukált antioxidáns védőmechanizmus elemei közötti kapcsolatrendszer megismerjük, meg kell vizsgálnunk az ebben szereplő antioxidáns enzimek aktivitásának és egyes reaktív komponensek szintjeit. Kísérleteinkben *Brassica juncea* növényeket használtunk. A növények nehézfém kezelése

után mértük a szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), peroxidáz (GPX), glutation reduktáz (GR) enzimek aktivitását és a nem-fehérje tiolok (glutation) mennyiségének változását. *In situ*, specifikus festés után mikroszkópiásan detektáltuk a növények gyökerében képződő reaktív oxigénformák közül a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és a NO megjelenését.

Eredményeink szerint a réz esetében megfigyelhető gyors NO keletkezési fázisban lipidperoxidációs és autoxidációs folyamatoknak van szerepe, míg a lassú fázisban illetve a kadmium esetében az oxidációs folyamatok mellett enzimatiszintézis is szerepet játszhat. A  $H_2O_2$  a szuperoxid anion dizmutációja során keletkezik, amely reakciót a SOD enzim katalizálja. Réz kezelés hatására emelkedett az enzim aktivitása a növények gyökerében, míg a kadmium kezelés nem okozott szignifikáns változást. Ez arra utal, hogy a réz okozta oxidatív károsítás jelentősebb mértékű, mint a  $Cd^{2+}$  esetében, mivel jelentősebb a  $H_2O_2$  akkumuláció a gyökérszövetekben. A fénymikroszkópos felvételek azonban ellenkező képet mutattak: a  $H_2O_2$ -t jelző barna elszíneződés erőteljesebb volt a  $Cd^{2+}$  kezelt növények esetében, míg a réz kezelt növények gyökere a kontroll növényekhez hasonló elszíneződést mutatott. A jelenségre az antioxidatív enzimek aktivitásának változása ad magyarázatot. A  $H_2O_2$  eliminálásában részt vevő kulcsenzimek, a kataláz, illetve a peroxidáz aktivitásai a gyökérben megnövekedtek a nehézfém kezelés hatására, amely a réz esetében különösen szignifikáns volt. Az emelkedés a levélszövetekben jóval kisebb mértékű volt.

## Összefoglalás

Az elmúlt négy évben, a pályázat támogatásával végzett kutatómunkánk nagyban hozzájárult ahhoz, hogy világosabb képet kapjunk a nitrogén-monoxid jelmolekula szerepéről, hatásáról a vizsgált fiziológiai folyamatokban. Elsőként írtuk le az ozmotikus stressz hatására megjelenő gyors NO képződést („stressz-NO) borsó, búza és *Arabidopsis* gyökerekben valamint bizonyítottuk, hogy ez a korai, tranziens NO akkumuláció szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgyökér fejlődés indukálásához borsóban. Meghatároztuk az ozmotikus stressz, valamint az auxin indukálta- NO forrását. Bizonyítottuk, hogy az SNP által indukált változásokat részben a cianid okozza, ezért indokolt a kísérletekben többféle NO donor és gyökfogó használata. Kísérleteink révén fényt derítettünk a nitrogén-monoxid kulcsszerepére a fotoszintetikus elektron transzportlánc szabályozásában. Szintén elsőként írtuk le a réz kezelés hatására megjelenő gyors NO képződést gyökerekben. Meghatároztuk, hogy ebben a tranziens NO keletkezési fázisban lipid peroxidációs és autoxidációs folyamatoknak van szerepe, míg a lassú fázisban illetve a kadmium esetében az oxidációs folyamatok mellett enzimatiszintézis is szerepet játszhat.

A fent részletezett kutatómunka a pályázatban kitűzött céloknak maradéktalanul megfelel és eredményeink nemzetközileg elismert szakfolyóiratokban közlésre kerültek valamint számos független hivatkozással rendelkeznek. Jelenleg is keveset tudunk azonban a NO hatásmódjáról az egyes szignáltranszdukciós utakban, és a jelátvitel komponenseinek azonosítása is további kutatómunkát igényel.

### **Irodalomjegyzék:**

- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100-103
- Lamattina L, García- Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54:109-136
- Lynch J (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* 109: 7-13
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *TIPS* 2: 390-396
- Malamy JE, Ryan KS (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 899-909
- Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* 28:67-77
- Pasternak TP, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *J Exp Bot* 56:1991-2001
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot* 51: 1555-1562
- Wilkinson JQ, Crawford NM. (1993) Identification and characterization of a chlorate resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol Gen Genet* 239:289-297.
- Zolman BK, Yoder A, Bartel B (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* 156: 1323-1337
- Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 5:261-270

### **Tudományos közlemények listája:**

Az itt felsorolt közleményeken az OTKA támogatás ténye szerepel.

**L. Erdei, Zs. Kolbert:** Nitric oxide as a potent signalling molecule in plants, *Acta Biologica Szegediensis*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 0.000

független idéző közlemények száma: 1

**Zs. Kolbert, B. Bartha, L. Erdei:** Exogenous auxin- induced NO synthesis is nitrate reductase- associated in Arabidopsis thaliana root primordia, *Journal of Plant Physiology*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 2.230

független idéző közlemények száma: 4

**Zs. Kolbert, B. Bartha, L. Erdei:** Osmotic stress-and indole-3-butyric acid-induced NO generations are partially distinct processes in root growth and development in Pisum sativum L., *Physiologia Plantarum*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 2.190

független idéző közlemények száma: 1

**Zs. Kolbert, L. Erdei:** Involvement of nitrate reductase in auxin-induced NO synthesis, *Plant Signaling and Behavior*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 0.000

független idéző közlemények száma: 0

**Zs. Kolbert, N. Sahin, L. Erdei:** Early nitric oxide (NO) responses to osmotic stress in pea, Arabidopsis and wheat, *Acta Biologica Szegediensis*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 0.000

független idéző közlemények száma: 0



**B. Wodala, Zs. Deák, I Vass, L. Erdei, I Altorjay, F. Horváth:** In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves, *Plant Physiology*, **2008**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 6,367

független idéző közlemények száma: 0

**B. Bartha, Zs. Kolbert, L. Erdei:** Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Cern. and *Pisum sativum* L., *Acta Biologica Szegediensis*, **2005**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 0.000

független idéző közlemények száma: 3

**Zs. Kolbert, B. Bartha, L. Erdei:** Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress, *Acta Biologica Szegediensis*, **2005**

dokumentum típusa: folyóiratcikk

impakt faktor: 0.000

független idéző közlemények száma: 1