

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A búza (*Triticum aestivum* L.) glutamin szintetáz enzim  
viselkedése abiotikus stresszfolyamatok (a szárazság- és az  
alumíniumstressz) során**

*Készítette:*  
**Nagy Zoltán**

*Témavezető:*  
**Dr. Pécsváradi Attila**  
egyetemi docens

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék  
Biológia Doktori Iskola

Szeged  
2013.

## Bevezetés

A glutamin szintetáz a nitrogén anyagcsere egyik kulcsfontosságú enzime az élőlényekben. Megtalálható a prokariótáktól kezdve a legfejlettebb eukarióta szervezetekig, gyakorisága és funkciója miatt nélkülözhetetlen fehérje. Meghatározó szerepe van a termés mennyiségének és minőségének alakulásában a mezőgazdaságilag fontos növényeknél, ahol két izoformáját találhatjuk a glutamin szintetáznak (GS, 6.3.1.2). A GS1 a citoszolban helyezkedik el, elsődleges szerepe az aminosav anyagcserében van, míg a kloroplasztisban lokalizálódó GS2 pedig a fotorespiráció során keletkező ammónia megkötését végzi el. Az eddigi kutatások tükrében el lehet mondani, hogy mind a szárazság mind az alumínium stressz esetében lehet szerepe ennek a fehérjének.

A mezőgazdasági termelés legfontosabb korlátozó tényezői a kedvezőtlen környezeti tényezők. Ezeket a növekedés és termésérlelés szempontjából káros hatásokat összefoglalóan stresszfaktoroknak nevezzük. Doktori munkámban két abiotikus stressz, a vízhiány és az alumínium jelenléte, hatását vizsgáltam meg búza növény (*Triticum aestivum* L.) esetében a glutamin szintetáz enzim vonatkozásában. A kenyérbúza az emberi étkezés egyik alapvető fontosságú gabonája. A magyarországi mezőgazdasági termelésbe bevont területének is a nagy részét a búza vetésterülete teszi ki és nem csak az emberi étkezésben, hanem az állati takarmányozásban betöltött szerepe is nagy. A nemesítés során fontos szempont lett a termésmennyiség növelése mellett a stresszhatásokkal szembeni ellenállóság is, illetve a szélsőséges körülmények között a minél kisebb termésveszteség elérése.

## Célkitűzések

A glutamin szintetáz kulcsszerepet játszik a növények nitrogén metabolizmusában, fontos szerepe van a növekedési és öregedési folyamatokban egyaránt. Mivel a környezeti faktorok jelentősen képesek megváltoztatni a növény fiziológiai állapotát, ezért fontos ezzel az enzimmel alapkutatói szinten is foglalkozni. Kísérleteink célja az az volt, hogy búza növények (*Triticum aestivum* L.) különböző genotípusaiban megvizsgáljuk szárazság és alumínium stressz alatt a glutamin szintetáz mennyiségi, aktivitási és enzimkinetikai változásait.

Vízhiány során a növény öregedési folyamatai felgyorsulnak. Az egyéves egyszikű növényekre általában a szekvenciális öregedés jellemző optimális körülmények között. Azaz a levelek a gyökér felől a termés felé haladva, a hormonok által szabályozott „sink-source” viszonyoknak megfelelően, fokozatosan lépnek be az öregedési folyamatba. Az elhaló levelekből folyamatosan szállítódnak a tápanyagok a kalász irányába. Kísérleteinkben több búza genotípus öregedését követjük figyelemmel öntözött és vízhiányos körülmények között. Mivel a búza terméshozama a virágzaskor a legérzékenyebb a környezeti hatásokra, ezért úgy állítottuk be a kísérleti rendszert, hogy a növények virágzásakor kezdjük meg a szárazság stressz előidézését ellenőrzött körülményeket biztosító üvegházban. A növényekben végbe menő változásokat az öregedő levelekből vett minták vizsgálatával követtük nyomon. Mértük a levelek fehérje tartalmát, natív poliakrilamid gélelektroforézissel a *Rubisco* tartalmat vizsgáltuk. A glutamin szintetáz aktivitását is mértük illetve western blot analízissel az izoenzim arányát is meghatároztuk.

A GS bivalens fémionokat kötő enzim, érzékeny a fém stresszre, ezért is érdemes vizsgálni a GS és a fémionok kapcsolatát. Az Al(III) eddig ismert kémiai természete (vizes oldatokban tapasztalható bonyolult és nehezen reprodukálható viselkedés) miatt viszonylag kevés információval rendelkezünk hatásának pontos mechanizmusáról. Az  $Al^{3+}$  a legtöbb esetben toxikus az élőlényekre. A legtöbb növény működtet a szervezetében valamilyen rendszert, amivel el tudja kerülni az alumínium káros hatásait. Az egyik ilyen stratégia az alumínium komplexbe vonása különböző szerves savakkal. Egyes alumínium komplexek *in vitro* aktiválják a GS-t. Az Al(III)NTA komplex az egyik legjobb ilyen aktivátora a GS-nek. Munkám célja megvizsgálni, hogy az Al(III)NTA komplex milyen módon növeli a GS aktivitását, ennek érdekében kinetikai vizsgálatokat végeztünk. Az elsődleges cél annak kiderítése, hogy a GS képes-e alumíniumot kötni. *In vitro* körülmények között szeretnénk kimutatni magnézium és alumínium kötődését a GS-hez, valamint megtudni, hogy milyen kapcsolat van az alumínium és magnézium között a GS-hez kötődés képességében. Ezen kérdések megválaszolásához poliakrilamid gélelektroforézist, western blot analízist, spektrofotometriás enzimaktivitás mérést és ICP-AES technikát vettünk igénybe.

A dolgozatomban a következő kérdésekre kerestünk választ:

- a) Szárazságstressz indukált levél szenescencia során, hogy változnak a „sink-source” viszonyok, és milyen élettani stratégiákat figyelhetünk meg a különböző genotípusú búza növényekben?

- b) Milyen kapcsolat van a vízhiány okozta stressz alatt a búza növény szén és nitrogén anyagcséréje között?
- c) Hogy változik a glutamin szintetáz aktivitása mennyisége és az izoenzimek aránya szárazságstressz hatására búza növényekben?
- d) Milyen hatással van a savas növekedési közegben az alumíniumnak a fiatal búza fejlődésére?
- e) Van-e az alumíniumnak közvetlen hatása a glutamin szintetázra?
- f) Milyen hatása van az Al(III)NTA szerves sav komplexnek a glutamin szintetázra?

## **Anyagok és módszerek**

### **Növényi anyag:**

Az általunk vizsgált kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) fajták a következők voltak a szárazságstressz esetében: Cappelle Desprez, Mv Emese, GK Élet, Kharchia, Kobomugi és Plainsman V. Az alumínium hatásait Jubilejnaja-50 nevű búzafajtán vizsgáltuk.

### **Kezelések:**

A vízhiány vizsgálata esetén a kalászó növényeket a kontroll csoport esetében a talaj 100 %-os vízkapacitásának 60%-ra, a stresszelt növényeket a 25%-ra öntöttük vissza a talaj tömege alapján. Alumínium stressz vizsgálatánál az egyhetes növényeket 0, 10, 50 és 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ -t tartalmazó tápoldatban neveltük egy hétig, illetve a fehérjekivonatokat az alumínium nitrilo-triecsav (Al(III)NTA) komplexével kezeltük.

### **Fehérje kivonás és mennyiség mérés**

A begyűjtött levelekhez 1:3-as kivonási arányban adtunk hűtött enzim extrakciós puffert. A homogenizálást kerámia dörzscsészében kvarchomokkal végeztük. A minták fehérje tartalmát Bradford szerint (Bradford, 1976) határoztuk meg minden új növényi minta esetén.

### **Glutamin szintetáz aktivitásának mérése**

A levelekben a glutamin szintetáz (GS, EC 6.3.1.2) jelenlétét, valamint aktivitását módosított szintetáz reakció segítségével tudjuk kimutatni és megmérni (Rhodes és mtsai. 1975).

### **Natív gélelektroforézis**

A fehérjék natív, molekulaszúlytól és felületi töltéstől függő elválasztását Laemmli módszerével végeztük (Laemmli 1970) poliakrilamid gélben. A glutamin szintetáz gélbentörténő aktivitásmérése is az így megfuttatott gében történt, valamint az izoenzimeket is szétválasztása így történt meg.

### **Western blot**

A glutamin szintetáz izoenzimek azonosításához elsődleges antitestként poliklonális anti-GS ellenanyagot használtunk. Másodlagos antitestként pedig Protein-A-t, melyre egy alkalikus foszfatáz volt kötve, ami színreakciót adott megfelelő szubsztrátok használata mellett (Bennett és Cullimore 1989).

### **A növények és a glutaminszintetáz fémion tartalmának meghatározása**

A géldarabok és a növényi részek salétromsavas emésztése után induktív csatolású plazmaemissziós spektrométerrel lett meghatározva azok fémion tartalma.

## Eredmények és értékelésük

Megvizsgáltuk a búza növényekben a glutamin szintetáz változásait a két féle környezeti stressz hatására és az eredmények alapján a következtetéseink az alábbiak:

### I. Szárazság stressz

A növényeket a szárazságstressz hatására már szemmel láthatóan is két külön csoportokra lehetett osztani. Azonban az **öntözött körülmények között nem volt eltérés a genotípusok között**. A virágzás utáni kilencedik napon **mindegyik búzanövény az egyszikűekre jellemző szekvenciális öregedést mutatott** több levélemeleten vizsgálva a fehérje- és *Rubisco* tartalmat és a GS aktivitást.

**1. De vízhiány hatására felgyorsult zászlóslevél elszáradást mutatott** a növények egy csoportja: Cappelle Desprez, GK Élet és a Kobomugi. A Plainsman V, Mv Emese és Kharchia megtartotta a szekvenciális öregedésre jellemző levél leszáradási sorrendet.

**2. A fehérje koncentráció változások is két féle mintázatot mutattak.** Szárazság hatására a Cappelle Desprez, GK Élet és Kobomugi fajtában a zászlóslevelekben kisebb fehérjekoncentrációt mértünk, mint az alatta lévő levélben. A többi búza genotípus esetében a zászlóslevélnek volt magasabb fehérje tartalma az alsó levelekhez képest.

**3. Rubisco mennyiség változások követték az összes oldott fehérje koncentráció-változásokat** mindegyik növény esetében.

**4. Az *in vitro* mért glutamin szintetáz aktivitás az öregedő levelekben drasztikusan lecsökkent.** A levelekben mért fehérje koncentráció csökkenéssel együtt csökkent a GS aktivitás is. Az öregedő levelekben a kloroplasztiszban elhelyezkedő GS2 bomlott le először. A citoszólikus GS1 mennyisége nem csökkent, egyes esetekben még növekedést is mutatott.

**5. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a GS2 jó indikátora a kloroplasztisz állapotának illetve a GS aktivitás változása jól korrelál a növény öregedési folyamataival.**

**6. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az általunk vizsgált búza genotípusok két eltérő szárazságstressz ellen stratégiával rendelkeznek.** A Cappelle Desprez, GK Élet és Kobomugi a „menekülő” stratégiát alkalmazza, míg a Plainsman V, Mv Emese és a Kharchia

pedig a „toleráns” stratégiát. Élettani szempontból mindkét stratégia megfelelő, hiszen a növény szaporodása biztosított, de mezőgazdasági szempontból az utóbbi a kedvező.

## **II. Alumínium stressz**

**1. Az alumínium-klorid savas kémhatáson a búzanövény, elsősorban a gyökér növekedését gátolja, de nagy koncentráció esetén már a hajtás növekedése is sérül.**

**2. A búza leveléből izolált glutaminszintetázra az általunk vizsgált szerves savak többféleképpen hatnak. ennek háttérében a pH 7,5-ös kémhatáson megjelenő különböző alumínium formák állnak. A vizsgálataink alapján a GS-re az  $AlA(OH)_2$  forma hat aktivitás növelően.** (Az *A* az adott szerves savat jelöli.)

**3. Az *in vitro* az  $Al(III)NTA$  a GS aktivitását növeli növekvő magnéziumion koncentráció mellett.**

**4. Kimutattuk, hogy az aktivitás növekedést az alumínium közvetlen és stabil kötődése okozta.** A glutamin szintetáz két fémkötőhelye közül az egyik specifikusabb ahhoz csak  $Mg^{2+}$  tud kötődni, de a másik kötőhely affinitása kisebb. De a **magnéziumion jelenléte mindenképpen szükséges a GS működéséhez.**

**5. *In vivo* kimutattuk, hogy az egyhetes búzanövények alumíniumot képesek felvenni a tápoldatból és a hajtásba transzportálni,** ahol szintén a GS aktivitás növekedését mutattuk ki.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a glutamin szintetáz a növényvilágban a szárazság és fémion kötőhellyel rendelkező fehérjeként a fémstresszben is fontos szerepet játszó enzim. Kutatásaink zárószavaként kijelenthetjük, hogy a GS indikátor szerepének fontosságát a későbbi kutatások során vagy gyakorlati alkalmazások fejlesztésekor (pl. egyes növény genotípusok toleranciájának tesztelése, vagy toxikus alumínium jelenlét kimutatása) figyelembe kell venni.

## **Publikációs lista**

(\* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

### **Cikkek:**

\* Pécsváradi, A., **Nagy, Z.**, Varga, A., Vashegyi, Á., Labádi, I., Galbács, G. and Zsoldos, F. Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01167.x *Physiologia Plantarum* 135: 43-50, 2009. (IF: 2,708)

**Nagy, Z.**, Németh, E., Gallé, Á., Csiszár, J., Erdei, L. and Pécsváradi, A. Changes in nitrogen metabolism of different wheat cultivars following *Fusarium* infection. HURO/0901/1472.2.2 Szeged – Timișoara axis for the safe food and feed SZETISA1, Book of Final Report, pp. 61-67, Szeged, 2012.

\* **Nagy, Z.**, Németh E., Guóth, A., Bona, L., Wodala, B., Pécsváradi, A. Metabolite indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.03.001 *Plant Physiology and Biochemistry* 67, 48-54, 2013. (IF: 2,838)

### **Poszterek:**

**Nagy, Z.** and Pécsváradi, A.: Wheat Chloroplastic Glutamine Synthetase Is Activated by Aluminium, 3rd IFSDAA International Seminar on Crop Science for Food security, Bio-energy and Sustainability 1-3 June 2010 in Szeged, Hungary

**Nagy, Z.**, Aleksza, D., Pécsváradi, A.: Aluminium activates the chloroplastic glutamine synthetase in wheat, 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, 13-15. October 2010, Szeged, Hungary

**Nagy, Z.**, Péter Szabó, K., Németh, E., Pécsváradi, A.: Glutamine synthetase isoenzymes of *Nicotiana tabacum* callus of leaf origin, A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31. – szeptember 2., Szeged, Magyarország



**Nagy, Z.** and Pécsváradi, A.: Role of glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco in drought stress, 5th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology, September 6, 2011 – September 9, 2011, Wroclaw, Poland

**Előadás, prezentáció:**

Pécsváradi, A., **Nagy, Z.**, Németh, E.: Changes in glutamine synthetase activity and in protein pattern of wheat leaves after *Fusarium* infection. Szeged – Timisoara axis for the safe food and feed (SZETISA1), Hungary – Romania Cross-Border Co-operation Programme 2007-2013, Timisoara, Romania, January 26-27.01.2012

**Nagy, Z.**, Németh, E., Pécsváradi, A.: Separation of protein content of stressed poplar leaves by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees (OXIT), Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme, November 20, 2012, Szeged, Hungary

A Ph. D. értekezés alapjául szolgáló munkát a “Búzakalász” konzorciumi pályázat (NKFP 4/064/2004), a T46692 számú OTKA pályázat, valamint a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 pályázat tette lehetővé.