

*“Tudomány és művészet közt sok a hasonlóság: mindegyiknek van metodikája, vannak vívmányai, és mindegyik felismeréseket közöl...”*

(Németh László)

Felismerések a nitrogén oxid sejtosztódást és  
differenciációt szabályozó tulajdonságáról lucernában

Doktori (Ph.D.) értekezés

ÖTVÖS KRISZTINA

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet

Témavezető: Dr. Fehér Attila

Szeged

2006

## Tartalomjegyzék

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Rövidítések jegyzéke</u> .....                                                                                                   | 4  |
| <u>1. Bevezetés</u> .....                                                                                                           | 6  |
| <u>2. Irodalmi áttekintés</u> .....                                                                                                 | 8  |
| <u>2.1. A szomatikus embriogenezis</u> .....                                                                                        | 8  |
| <u>2.2 A sejtosztódási ciklus, a differenciáció és a fejlődés kapcsolata növényekben</u> .....                                      | 9  |
| <u>2.2.1. A differenciáció növény-specifikus sajátosságai</u> .....                                                                 | 9  |
| <u>2.2.2. A sejtciklus szabályozása</u> .....                                                                                       | 11 |
| <u>2.3. A nitrogén oxidról</u> .....                                                                                                | 17 |
| <u>2.3.1. Történeti áttekintés</u> .....                                                                                            | 17 |
| <u>2.3.2. Az NO fizikai és kémiai tulajdonságai</u> .....                                                                           | 18 |
| <u>2.3.3. A nitrogén oxid képződése biológiai rendszerekben</u> .....                                                               | 20 |
| <u>2.3.3.1. A nitrogén oxid képződésének enzimatis útjai</u> .....                                                                  | 20 |
| <u>2.3.3.1.1. A Nitrogén Oxid Szintáz (NOS)</u> .....                                                                               | 20 |
| <u>2.3.3.1.2. Az NO keletkezésének enzimatis útjai növényekben</u> .....                                                            | 22 |
| <u>2.3.3.2. Az NO képződésének nem enzimatis útja növényekben</u> .....                                                             | 27 |
| <u>2.3.4. Az NO donorokról</u> .....                                                                                                | 28 |
| <u>2.3.5. Nitrogén oxid kimutatása növényekben</u> .....                                                                            | 29 |
| <u>2.3.6. Nitrogén oxid fiziológiai hatásai növényekben</u> .....                                                                   | 30 |
| <u>2.3.6.1. NO, mint növekedés és fejlődés szabályozó</u> .....                                                                     | 31 |
| <u>2.3.6.2. NO és a klasszikus fitohormonok kapcsolata</u> .....                                                                    | 34 |
| <u>2.3.6.3. NO és a programozott sejthalál</u> .....                                                                                | 35 |
| <u>2.3.6.4. NO és az abiotikus stresszválasz</u> .....                                                                              | 37 |
| <u>2.3.6.5. NO a betegségekkel szembeni védekezés modulátora</u> .....                                                              | 38 |
| <u>2.3.7. NO és a sejtciklus szabályozása</u> .....                                                                                 | 39 |
| <u>3. Célkitűzések</u> .....                                                                                                        | 41 |
| <u>4. Anyagok, módszerek és a kísérleti rendszer ismertetése</u> .....                                                              | 42 |
| <u>4.1. A kísérleti növények és sejtkultúrák fenntartása</u> .....                                                                  | 42 |
| <u>4.2. Lucerna levélprotoplaszt izolálása és tenyésztése</u> .....                                                                 | 42 |
| <u>4.3. A sejtek életképességének, morfológiájának és osztódásának meghatározása</u> .....                                          | 44 |
| <u>4.4. Az S fázis arányának megállapítása BrdU sejtmagi DNS-be történő beépülésével</u> .....                                      | 45 |
| <u>4.5. Áramlásos citometria</u> .....                                                                                              | 45 |
| <u>4.6. Lucerna szuszpenzió sejtkultúra szinkronizálása kettős foszfát éhezéssel</u> .....                                          | 46 |
| <u>4.7. Fehérje extrakció</u> .....                                                                                                 | 46 |
| <u>4.8. Immunoblot</u> .....                                                                                                        | 47 |
| <u>4.9. A CDK aktivitás meghatározása</u> .....                                                                                     | 48 |
| <u>4.10. Génexpressziós vizsgálatok</u> .....                                                                                       | 49 |
| <u>4.11. Az NO fluoreszcens kimutatása DAF-2 DA-val</u> .....                                                                       | 50 |
| <u>5. Kísérleti eredmények</u> .....                                                                                                | 51 |
| <u>5.1. A kísérleti rendszerek</u> .....                                                                                            | 51 |
| <u>5.1.2. A lucerna levélprotoplaszt rendszer fő jellemzői</u> .....                                                                | 51 |
| <u>5.1.2. A lucerna sejtuszuszpenziós kultúra fő jellemzői</u> .....                                                                | 54 |
| <u>5.2. Az NO hatása lucerna protoplaszt eredetű sejtek sejtosztódására és morfológiájára</u> .....                                 | 54 |
| <u>5.2.1. Az NO hatással van a tenyésztés harmadik napján DNS replikációra képes levélprotoplaszt eredetű sejtek arányára</u> ..... | 54 |
| <u>5.2.2. Az NO donor SNP auxin koncentráció függő módon segíti elő a sejtosztódást lucerna levélprotoplaszt kultúrában</u> .....   | 56 |

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2.3. Az NO és a fitohormon auxin kapcsolata .....                                                              | 58  |
| 5.2.4. A NOS gátlószer L-NMMA gátolja a sejtosztódás aktivációját, de annak progresszióját nem .....             | 60  |
| 5.2.5. NO hatása G1 ciklin gének expressziójára protoplaszt eredetű sejtekben ....                               | 64  |
| 5.2.6. Az NO nem befolyásolja a sejtciklus progressziót exponenciálisan szaporodó lucerna sejtuszpenzióban ..... | 66  |
| 5.3. NO hatása lucerna protoplaszt eredetű sejtek differenciációjára, morfogenezisére .....                      | 73  |
| 5.4. Az NO detektálása protoplaszt eredetű sejtekben.....                                                        | 76  |
| 6. Eredmények értékelése .....                                                                                   | 81  |
| 6.1. Az NO szerepet játszik a sejtosztódás aktivációjában, de nem annak progressziójában .....                   | 81  |
| 6.2. Az NO szerepet játszik a 2,4-D által indukált embriogén sejtcsoportok kialakításában.....                   | 84  |
| 7. Összefoglalás .....                                                                                           | 87  |
| 8. Köszönetnyilvánítás .....                                                                                     | 89  |
| 9. Referencia Lista .....                                                                                        | 90  |
| 10. Ph.D. thesis .....                                                                                           | 105 |
| 11. Publikációs lista .....                                                                                      | 112 |
| 12. Függelék.....                                                                                                | 113 |

## Rövidítések jegyzéke

|                               |                                                       |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 2,4-D                         | 2,4-diklórfenoxiecetsav                               |
| 4-AF DA                       | 4-aminofluorescein diacetát                           |
| ABS                           | abszcizin sav                                         |
| APC                           | „anaphase promoting complex”                          |
| ARF                           | „auxin response factor”                               |
| AuxRE                         | „auxin responsive promoter element”                   |
| BH4                           | tetrahidrobiopterin                                   |
| BrdU                          | 5-bróm-deoxi-uridin                                   |
| cADPR                         | ciklikus adenzin dinukleotid foszfát ribóz            |
| CAK                           | CDK-aktiváló kináz                                    |
| CDK                           | ciklin dependens kináz                                |
| cGMP                          | ciklikus guanozin-monofoszfát                         |
| CHS                           | „chalcone synthase”                                   |
| CKI                           | CDK-inhibitor                                         |
| CKS                           | CDK dokkoló faktor                                    |
| CPR                           | citokróom P450                                        |
| Cyc                           | ciklin                                                |
| DAF                           | diaminofluorescein                                    |
| DAPI                          | 4'-6-diamidino-2-fenilindol                           |
| DTT                           | ditiotreitól                                          |
| EDRF                          | „endothelium-derived relaxing factor”                 |
| EPR                           | elektron paramágneses rezonancia                      |
| FAD                           | flavin-adenin-dinukleotid                             |
| FITC                          | fluorescein izotiocianát                              |
| FMN                           | flavin-mononukleotid                                  |
| Furoxan                       | 4-fenil-3-furoxankarbonitril                          |
| GS                            | gibberelin sav                                        |
| GTPáz                         | guanidin trifoszfátáz                                 |
| GTP-kötő                      | guanidin trifoszfát-kötő                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | hidrogén peroxid                                      |
| Hb2                           | 2-es típusú hemoglobin                                |
| HNO <sub>2</sub>              | salétromos sav                                        |
| HR                            | hiperszenzitív reakció                                |
| IES                           | indol ecetsav                                         |
| IP <sub>3</sub>               | inozitol trifoszfát                                   |
| iSNP                          | inaktivált SNP                                        |
| KRP                           | p27Kip-szerű fehérje                                  |
| L-NMMA                        | L-NG-monometil-L-arginin                              |
| MAPK                          | mitogén aktivált protein kináz                        |
| mRNS                          | „messenger” RNS                                       |
| N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | dinitrogén trioxid                                    |
| NADPH                         | nikotinamid adenin dinukleotid foszfát redukált forma |
| Ni-NOR                        | nitrit-nitrogén oxid reduktáz                         |
| NO                            | nitrogén oxid/nitrogén monoxid                        |
| NO <sup>+</sup>               | nitrozónium ion                                       |
| NO <sub>2</sub>               | nitrogén dioxid                                       |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | nitrit                                                |

|                              |                                                         |
|------------------------------|---------------------------------------------------------|
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | nitrát                                                  |
| NOHA                         | N-hidroxiarginin                                        |
| NOR-3                        | (±)-etil-2-[(E)-hidroxiimino]-5-nitro-3-hexénamid       |
| NOS                          | nitrogén oxid szintáz                                   |
| NR                           | nitrát reduktáz                                         |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | szuperoxid anion                                        |
| OH <sup>-</sup>              | hidroxil ion                                            |
| ONOO <sup>-</sup>            | peroxinitrit                                            |
| PAL                          | fenilalanin ammónia-liáz                                |
| PCD                          | „programmed cell death”                                 |
| PCR                          | polimeráz láncreakció                                   |
| PI                           | propidium jodid                                         |
| PIN                          | „protein inhibitor of NOS”                              |
| PMSF                         | fenilmetilszulfonil fluorid                             |
| PTIO                         | 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid      |
| PVDF                         | polivinilidén-difluorid                                 |
| RAM                          | „root apical meristem”                                  |
| Rb                           | retinoblasztoma                                         |
| ROS                          | „reactive oxygen species”                               |
| RSNO                         | S-nitrozotiol                                           |
| S1P                          | szfingozin 1 foszfát                                    |
| SA                           | szalicil sav                                            |
| SAM                          | „shoot apical meristem”                                 |
| SAR                          | „systemic acquired resistance”                          |
| SDS PAGE                     | nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis |
| SERK                         | szomatikus embriogenézis receptor kináz                 |
| sGC                          | szolubilis guanilát cikláz                              |
| SIN-1                        | 3-morfolinoszidonimin                                   |
| SNAP                         | N-acetil-3-(nitrozotio)-D-valin                         |
| SNP                          | nátrium nitroprusszid                                   |
| XOR                          | xantin oxidoreduktáz                                    |

## 1. Bevezetés

A növények helyhez kötött életmódot folytatnak, így az életkörülményekhez anyagcseréjük és fejlődésük folyamatos változtatásával tudnak alkalmazkodni. Ennek köszönhetően a növények egyedfejlődési programja sokkal nyitottabb, mint az állatoké, egész életük folyamán képesek új szervek képzésére (organogenezis), sőt testi sejtjeikben aktiválható az embriófejlődés genetikai programja is (szomatikus embriogenezis).

Laboratóriumunkban hosszabb idő óta vizsgáljuk, a szomatikus embriogenezis kiváltásában a stressz szerepét. PhD munkám, amit teljes egészében az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében Dr. Fehér Attila irányításával, kezdetben a Sejtosztódás és Differenciálódás, majd a Funkcionális Sejtbiológia Csoportban végeztem, ezzel kapcsolatban a nitrogén oxid (NO), mint potenciális jelátvivő szerepének tisztázását tűzte ki célul.

Vizsgálati modellként a lucerna protoplasztok unicelluláris rendszerét használtuk. Az embriogén lucerna genotípus (*Medicago sativa* ssp. *varia* A2) levél protoplaszt eredetű sejtjeinek vizsgálata lehetővé teszi a sejtosztódásuk aktiválódását kiváltó legkorábbi események megfigyelését. Ennek során molekuláris és citológiai módszereket is igénybe vettünk.

A sejtciklus S fázisának meghatározására a timidin analóg BrdU (5-brómdeoxiuridin) replikálódó DNS-be történő beépülését és ennek immunocitológiai kimutatását használtuk. A G0/G1 és G1/S fázisok meghatározásához a sejtosztódást szabályozó ciklin-függő kináz (Medsa;CDKA;1,2) aktivitásának és fehérje szintjének, valamint különböző ún. G1 ciklinek transzkriptumának (Medsa;CYCA2;1, Medsa;CYCD3;1) ill. fehérje szintjének (Medsa;CYCD5;1) változásait követtük

nyomon, hogy korrelációt keressünk az NO, mint jelátvivő molekula jelenléte és a sejtosztódási/stressz válasz között.

Kísérleteink során a táptalajhoz adagolt kémiai ágenssekkel, nitrogén oxid donorokkal (pl. SNP, SNAP), nitrogén oxid szintáz (NOS) inhibitorral (pl. L-NMMA) és a nitrogén oxidot megkötő, ún. „NO fogó” (pl. PTIO) vegyületekkel befolyásoltuk a vizsgált jelátvivő endogén koncentrációját.

Kutatásainkat a szomatikus embriogenezis aktiválódásának irányába is kiterjesztettük. Ennek eredményeként sikerült igazolnunk, hogy az NO szerepet tölt be ebben a folyamatban is. Az embriogenezis programjának indukálódását molekuláris marker segítségével követtük nyomon. Azon szabályozó gének egyikének a kifejeződését vizsgáltuk, melyről korábban igazolták, hogy a géntermék mennyisége korrelál az embriogén képesség megnyilvánulásával vegetatív sejtekben (*SERK*).

Eredményeink tükrében kijelenthető, hogy a nitrogén oxid elősegíti a lucerna protoplasztok auxin-indukált sejtosztódásának aktiválódását és stimulálja az embriogén sejtcsoportok kialakulását. Tudomásunk szerint növényekben ez az első olyan értekezés, mely kísérletekkel alátámasztva igazolja az NO kapcsolatát a sejtosztódás ill. a sejt differenciáció szabályozásával.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A szomatikus embriogenézis

Növényekben az embriogenézis folyamata nem korlátozódik a megtermékenyített petesejtre, hanem sokféle sejtípusban, így pl. szomatikus sejtekben is indukálható természetes és mesterséges úton egyaránt. Habár az adott faj/genotípus genetikai háttere egyértelműen meghatározza a szomatikus embriók képződésének lehetőségét, az embriogén kompetencia kifejeződését fejlődési és fiziológiai faktorok is befolyásolják. Egy általánosan elfogadott definíció szerint, az embriogén kompetenciával bíró sejtek azok a sejtek, melyek megfelelő szignálra embriókká képesek differenciálódni (Halperin, W. 1969).

Egy differenciált sejtben az embriogén fejlődési út beindulásának feltétele a sejt „újra” programozása, reaktivációja. A differenciált funkciók elvesztését követően egy új, embriók kialakulásához vezető program iniciálódik, mely a teljes génexpressziós mintázat átalakulásával mélyreható morfológiai és fiziológiai változásokat hoz a sejt életében (Fehér, A. 2005). A reaktivációs folyamat során megfelelő ingerre a nyugalmi állapotban lévő sejt sejtciklusa felszabadul az átmeneti gátlás alól és osztódások sorozatán keresztül végül embrióvá differenciálódik.

Egy újabb hipotézis szerint a szomatikus embriogenézis egy, az auxin exogén és/vagy endogén szintjében történő változásra adott általános válasz reakciónak tekinthető, melynek kiváltásában lényeges elem az oxidatív stressz (Fehér, A. 2005; Pasternak, T. P. 2002).

A szomatikus embriogenezis programjának elindulása együttjár a differenciált sejtek osztódásának reaktiválásával. Lucerna levélprotoplasztok esetében az első



sejtosztódás jellege (aszimmetriája) már jelzi az embriogén képesség kialakulását (Bögre, L. és mtsai. 1990; Pasternak, T. P. és mtsai. 2002).

Mindezek alapján a szomatikus embriogenezis indukciója szorosan kapcsolódik a sejtek stressz válaszához és osztódásának szabályozásához.

## **2.2 A sejtosztódási ciklus, a differenciáció és a fejlődés kapcsolata növényekben**

### **2.2.1. A differenciáció növény-specifikus sajátosságai**

A többsejtű organizmusok és az azokat felépítő szervek a sejtek növekedése, proliferációja, differenciációja és a programozott sejthalál kombinációjaként megvalósuló folyamatok eredményeként épülnek fel. Ebben a tekintetben növények és állatok között három lényeges különbséget vehetünk észre.

1. Az állati szervezetekkel ellentétben a növény szervei nem az embrióban, hanem az embriogenezis után posztembrionálisan fejlődnek ki. Tulajdonképpen amit egy növényből láthatunk, kicsiny, folyton osztódó sejtcsoportok, a merisztémák aktivitásaként posztembrionálisan létrejött szervek összessége. A két legfontosabb merisztéma a hajtás és gyökér csúcsi részében található, SAM és RAM. A merisztémák a növény teljes életsiklusa alatt aktívak maradnak, a levél, szár, gyökér és egyéb szervek képződéséért felelősek.
2. A növényi sejteket sejtfal és az azokat összekötő citoplazmatikus csatornahálózatot alkotó plazmodezmák veszik körül. A növényi sejtek merev függetléi külső vázként működnek, a növény alakjának kialakítását és merevítését szolgálják. Ez ugyanakkor azt is jelenti, hogy a növényi sejtek fixáltak, sejtmozgás vagy sejtvándorlás számukra nem lehetséges. A sejtek

gyakran rostokba vagy oszlopokba rendeződnek, osztódásuknak tehát időben és térben rendkívül szabályozottnak kell lennie.

3. Az állati szervezetek válasza a környezet ingereire általában fiziológiás (pl. helyzetváltoztató mozgás), a növények azonban ugyanezen stimulusra fejlődésük mértékét és/vagy mintázatát változtatják meg. Mivel a növény fejlődése szoros összeköttetésben van a sejtosztódással, a külső környezetnek növényekben direkt sejtciklus szabályozó hatása lehet.

A növényi organogenezis során tehát különböző mértékben differenciálódott sejtek, fejlődési programjuknak megfelelően pluripotens állapotú sejtekké alakulnak át. Ezen fejlődési program megvalósulásához a sejtosztódás finom szabályozására, a sejtciklus feltartóztatására és/vagy reaktivációjára, valamint az endoreduplikáció és differenciáció összehangolt működésére van szükség.

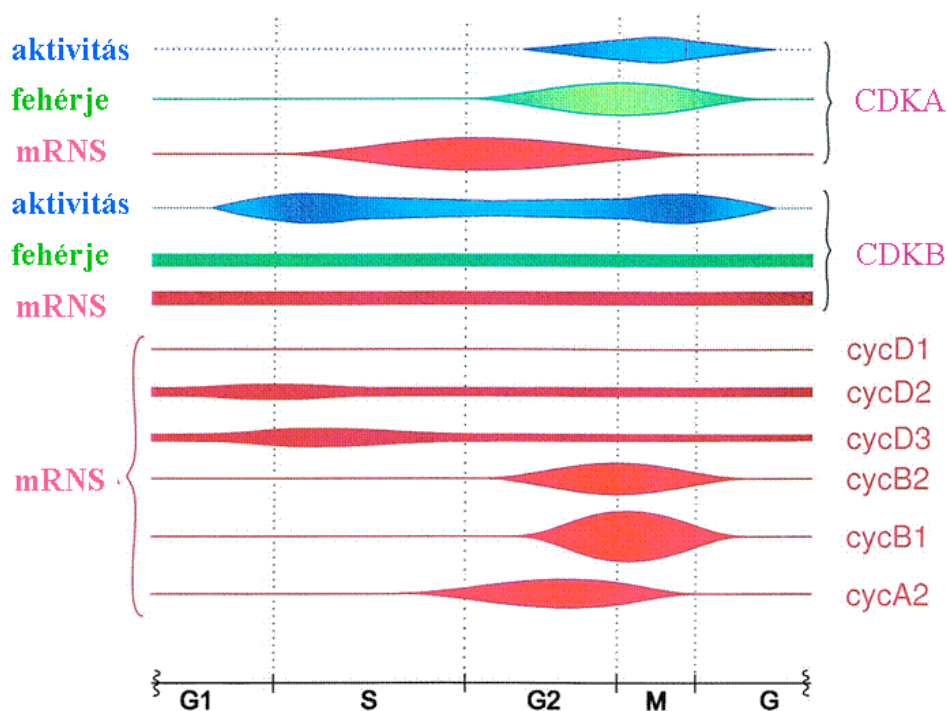
Egy sejt születése és későbbi osztódása közötti folyamat a sejtciklus. A sejtciklus négy fázisra osztható, ahol a DNS szintézis fázisát (S) és a mitotikus osztódás fázisát (M) két ún. „gap” vagy hézag fázis előzi meg (G1, G2). A G1 és G2 fázisban készül fel a sejt az S ill. az M fázisokra. A mitotikus fázis további négy szakaszra osztható: profázis, metafázis, anafázis, telofázis. A sejtosztódás alapvető folyamat a növényi szervezet fejlődésében, ezért nagyon fontos megértenünk azokat a lépéseket, melyek összekapcsolják a sejt növekedését annak osztódásával, így talán képesek leszünk megérteni azt a jelenséget is, hogy a növények élete miért mentes a spontán kialakuló sejt- és szövetburjánzástól, a rákos megbetegedésektől. Ennek egy magyarázata lehet az a napjainkban egyre inkább elfogadottabbá vált elképzelés, miszerint a sejtciklust szabályozó molekulák, amellet hogy kontrollálják a sejtosztódást, részt vesznek a sejt homeosztázisának kialakításában a fejlődési program kifejeződése alatt (Ramirez-Parra, E. 2005).

### 2.2.2. A sejtciklus szabályozása

Az eukarióták specifikus fehérjét fejlesztettek ki a sejtciklus szabályozására, melyek kapcsolóként működve lehetővé teszik, hogy a sejt az osztódási ciklus következő fázisába átlépjen. A sejtciklus szabályozó molekulák filogenetikai analízise valamint molekuláris, celluláris és genetikai módszerek tanúsítják, hogy a sejtciklus gépezete és annak szabályozása alapvetően konzervált az eukarióta organizmusok között.

A sejtciklus fő szabályozói olyan szerin/treonin kináz aktivitással rendelkező enzim komplexek, melyek működése alapvetően regulatórikus alegységeikkel, a ciklinekkel (Cyc) való kölcsönhatástól függ, ezért **ciklin dependens kinázoknak** (CDK) nevezték el őket (Morgan,D. O. 1997). A komplex reverzibilis aktiválódását ill. inaktiválódását specifikus kinázok szabályozzák. Az aktiválásért egy CDK-aktiváló kináz (CAK) a felelős, amelyik a CDK-t egy specifikus treoninon (Thr 160) foszforilálja. Van olyan kináz is, amely a CDK-t más aminosav-pozíciókban foszforilálja s ezáltal inaktiválja. A foszfát-csoportokat különböző foszfatázok (CDC25) távolíthatják el, a defoszforilálás pozíciótól függően aktiváló vagy inaktiváló hatású. További reguláció a CDK-inhibitorok (CKI ill. KRP, p27Kip-szerű fehérjék) segítségével lehetséges. A CKI reverzibilisen kötődik az aktivált CDK-ciklin komplexhez és megakadályozza, hogy az kifejtse kináz-aktivitását. A növényekben azonosított CDK-k hat csoportra oszthatók A-tól F-ig (Joubes,J. 2000; Vandepoele,K. 2002; Dewitte,W. 2003). A CDKA egy tipikus PSTAIRE motívumot tartalmazó CDK, az élesztő Cdc2 fehérjével homológ, a G1/S és G2/M átmenet fő regulátora. A CDKB fehérje növény specifikus CDK, a CDKB1 (PPTALRE) a sejtciklus S és M fázisaiban, míg a CDKB2 (PPTTLRE) a G2 és M fázisokban fejeződik ki. A CDKC (PITAIRE) kináz konstitutívan fejeződik ki a sejtciklus során és a transzkripció szabályozásában

vesz részt (Fülöp,K. 2005). A lucernában azonosított SPTAIRE CDK-t önálló csoportba, CDKE sorolták (Joubes,J. 2000), azóta *Arabidopsis thaliana*-ban (lúdfű) is megtalálták homológját (Vandepoele,K. 2002). Funkciójáról azonban nem sokat tudunk, a sejtciklus alatt expressziója változatlan (Magyar,Z. 1997). A CDKD és CDKF fehérjék CDK-aktiváló kinázként működnek.



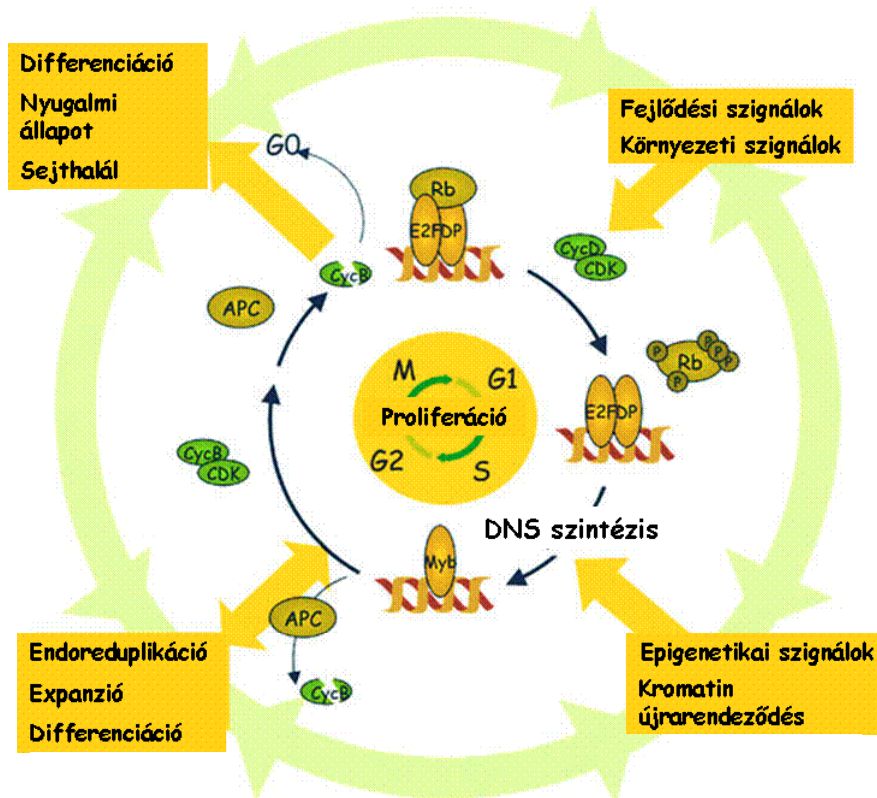
1. ábra. Különböző ciklin dependens kinázok (CDKA és CDKB) aktivitásának, fehérje és mRNS szintjének és ciklinek (cycA2, cycB1, cycB2, cycD1, cycD2, cycD3) mRNS szintjének változása a sejtciklus különböző fázisai alatt *Arabidopsis thaliana*-ban.

Az *Arabidopsis* genomban (<http://www.arabidopsis.org/home.html>) több mint 40, a sejtciklus fázisváltásaiban szerepetjátszó **ciklin** gén található, melyek termékeit A, B, D és H csoportokba sorolhatjuk (Vandepoele,K. 2002).

Az A és B típusú ciklinek szintje – a transzkripcionális kontroll mellett – szigorú sejtciklus függő proteolitikus szabályozás alatt áll (Genschik,P. 1998). Az A típusú ciklinek további három alcsoportra oszthatók; CycA1, CycA2 és CycA3. Az A típusú ciklinek a B típusúak előtt az S fázis kezdetén fejeződnek ki. A B típusú ciklineknek két alcsoportja van; CycB1 és CycB2. Expressziójuk az S fázis végétől az M fázis metafázisáig detektálható.

A D típusú ciklinek, a ciklin boks és egy a degradációjukért felelős szekvencia (PEST) mellett, egy konzervált LxCxE motívumot is tartalmaznak, mely segítségével képesek kölcsönhatás kialakítására retinoblasztoma-szerű (Rb vagy RBR) fehérjékkel (Ach,R.A. 1997; Huntley,R. 1998). A D típusú ciklineknek hét alcsoportja van; CycD1-D7 (Dewitte,W. 2003). Génjeik kifejeződésének mértéke az egyes altípusokban változó, többnyire a G1/S átmenet szabályozói, a sejtciklus aktiválásáért felelősek. A D típusú ciklinek növényekben szerkezetileg jóval heterogénebb csoportot alkotnak, mint emlős homológjaik. A különböző D típusú ciklinek ezenkívül CDK partnerükhöz (CDKA) való kötődésükben is eltérnek (Meijer,M. 2000), mely a G1/S átmenet növény-specifikus szabályozására hívja fel figyelmünket. A helyhez kötött életmód arra kényszeríti a növényi szervezeteket, hogy a környezet folyamatos jeláradatára megfelelően reagáljanak. A D típusú ciklinek fontos közvetítők a környezeti stimulusokra aktiválódó jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozása között.

H típusú ciklineket azonosítottak rizsből, nyárfából és Arabidopsisből is (Vandepoele,K. 2002; Yamaguchi, M. 2000). A H típusú ciklinek elsősorban CAK-okkal hatnak kölcsön a többi CDK-val nem. Feltételezhető, hogy a H típusú ciklinek a CAK fehérjék szabályozó alegységei (Yamaguchi,M. 2000).



**2. ábra.** Különböző külső és belső faktorok hatása a növényi sejtciklus szabályozására. Növényekben a sejtciklus két legfontosabb ellenőrző pontja a G1/S és G2/M átmenetnél található. A CDK/CycD komplex a G1/S átmenet során aktiválódik, fő feladata a Rb fehérje foszforilálása, mely az E2F transzkripciós faktor felszabadulásához, így az S fázis iniciációjához vezet. A G2/M átmenet során a CDK/CycB komplex aktivációja révén megkezdődik a sejtciklus mitotikus szakasza. Az APC („anaphase promoting complex”) által indukált CycB degradáció jelzi a mitózis végét. A sejtciklus gépezet úgy reagál a külső szignálokra (hormonok, cukor, fény), hogy integrálja azokat fejlődési, pozicionális és epigenetikai programjába. A növényi sejt az öt érő ingerekre módosítja többek között proliferációs képességét, nyugalmi állapotba kerül (G0), megnyúlik, differenciálódik, endoreduplikáción esik át vagy meghal. A nyilak a kapcsolatot reprezentálják a sejt ciklus gépezet és a különböző stimulusok ill. a sejtmegnyúlás és differenciáció vagy a megnyúlásos növekedés és a fejlődés között.

A növényi sejtciklus szabályozását a teljesség igénye nélkül az alábbiakban foglalhatjuk össze (2. ábra). A G1-fázis előrehaladásának sebességét főként a D típusú ciklinek mennyisége határozza meg. A G1-ciklinek szintézise sejtnövekedéshez

kapcsolt, s ez biztosítja, hogy a sejtek ne lépjenek át addig az S-fázisba, míg az osztódáshoz ideális méretet el nem érték. Ha a sejt mérete egy bizonyos határértéket túllép, akkor a G1-ciklinfüggő CDK-aktivitás hirtelen megnő. Az aktív CDK-komplex elkezd a megfelelő fehérjeszubsztrátokat foszforilálni, s ezzel beindítja a következő három fontos folyamatot; (i) a destrukciós boxokat tartalmazó ciklinek (S- és M-fázisos ciklinek) proteolitikus lebontása, hogy ezek a ciklinek ne képezhessenek CDK-kompleket, (ii) az S-fázishoz szükséges gének transzkripciójának beindítása, hogy a bioszintézisekhez és a szerkezetkialakításhoz szükséges fehérjék (pl. hisztonok) megfelelő mennyiségben rendelkezésre álljanak, (iii) az S fázis specifikus ciklin/CDK-komplex aktivitását gátló foszforilált CDK-inhibitor proteolitikus lebontása, ami azt eredményezi, hogy a felhalmozódott CDK aktivitása az S-fázisban hirtelen ugrásszerűen megnő. Ez a hirtelen aktivitásnövekedés kell ahhoz, hogy a DNS-replikáció a replikációs startpontoknál beinduljon.

Az S-fázis során A-típusú ciklinek szintetizálódnak, s ezek aktiválják megfelelő CDK partnerüket. Amikor a sejtek az S-fázis végére érnek, egy tirozin-kináz foszforilálja, s ezáltal inaktiválja a CDK-t. A G2-fázisban megjelennek az M-fázisos ciklinek (ciklin B), s a mitózis során ezek aktiválják a CDK-t. Az aktiválás azonban csak akkor eredményes, ha a CDK tirozinja defoszforilálódik, és ha a CDK-hoz ún. CKS dokkoló faktorok kötődnek. A CKS-eken keresztül további (+ vagy -) szabályozó molekulák kötődhetnek a CDK-hoz.

A mitózis folyamán az S- és M-fázisra jellemző ciklinek proteolitikusan degradálódnak, ezzel a G1-fázisos ciklinek szintézise a gátlás alól - ami az S-fázistól a telofázisig tart - felszabadul. A G1-re jellemző ciklinek lassú felhalmozódása a ciklus újbóli megindulásához vezet.

A sejtciklus során a sejtnek ún. ellenőrzési ponton kell átjutnia, ahol a ciklus le is állhat, ha a ennek során olyan hibák keletkeztek, amelyek kijavíthatatlanul mitotikus katasztrófához vezethetnek. Növényi sejtekben három ellenőrzési pont van: a G1-fázisban, közvetlenül a G1/S-átmenet előtt (tápanyaghiány, hibás DNS), a G2-fázisban, az M-fázisba való átmenet előtt (inkomplett DNS-replikáció, hibás DNS) és a metafázis/anafázis átmenetnél, a testvérkromatidok elválása előtt (összekapcsolatlan kromoszómák). Ha a sejt ezeken az ellenőrzési pontokon átjutott, azonnal elkötelezetté válik a ciklus következő szakaszába való belépésre, s innen kezdve a folyamat irreverzibilis.

A növényi sejtciklus hormonális szabályozásáról egyre több adat áll rendelkezésünkre (del Pozo,J.C. 2005). A sejtciklus G1 fázisa alatt növekedési faktorok, mint az auxin és a citokinin, az abszcizinsav, gibberelinsav, brasszinoszteroidok és a szaharóz is szabályozzák a D típusú ciklinek és a CDKA transzkripcióját és aktivitását (del Pozo,J.C. 2005; Stals,H. 2001; de Jager,S.M. 2005). Mitotikus aktivátorok, az auxin, a gibberelinsav és a citokininek pedig az A és B típusú CDK-k aktivitását befolyásolják oly módon, hogy elősegítik azok és az A és B típusú ciklinek transzkripcióját, szabályozva a G2/M átmenetet. A folyamat pontos, molekuláris szintű felderítése azonban a jövő feladata.



## **2.3. A nitrogén oxidról**

### **2.3.1. Történeti áttekintés**

Az 1980-as évek elejéig a nitrogén oxid biológiai jelentőségéről nem voltak információink. 1987-ben Moncada és munkatársai kimutatták, hogy a korábban EDRF-ként („endothelium-derived relaxing factor”) ismert anyag azonos az NO gázzal. 1992-ben a Science című folyóirat az év molekulájának választotta a nitrogén oxidot, az 1998. évi orvosi és élettani Nobel-díjat pedig három gyógyszerkutató kapta: Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad azon felfedezésükért, miszerint az NO az élő szervezet fontos, funkcionális alkotó eleme, ingerületközvetítő szignálja. Azóta robbanásszerűen megnőtt a nitrogén oxiddal foglalkozó kutatások és publikációk száma és kiderült, hogy az NO számtalan fontos élettani és kórélettani folyamatban vesz részt.

NO termelést növényekben először Klepper és munkatársai figyeltek meg 1975-ben (Klepper, LA. 1975). Kísérleteik során szója növényeket kezeltek fotoszintézist gátló herbicidekkel vagy más kemikáliákkal, melyek hatására NO emissziót észleltek (Klepper, LA. 1978). Magyarázatuk szerint az emisszió a felhalmozódott nitrit és különböző növényi metabolitok (pl. szalicilát származékok) kémiai reakciójának eredménye.

Az azóta eltelt 30 évben bebizonyosodott, hogy az NO növényekben olyan különböző fiziológiai folyamatokban működik közre, mint a betegségek elleni védekezés és az abiotikus stresszre adott válasz kialakítása, a sejthalál és az öregedés (szenescencia) folyamatai, szerepe van továbbá a mitokondriális respirációban, a gyökér fejlődésében, a csírázásban és a különböző hormon válaszok összehangolásában. Szinte nincs olyan élettani folyamat melyben közvetlen vagy közvetett úton e molekula

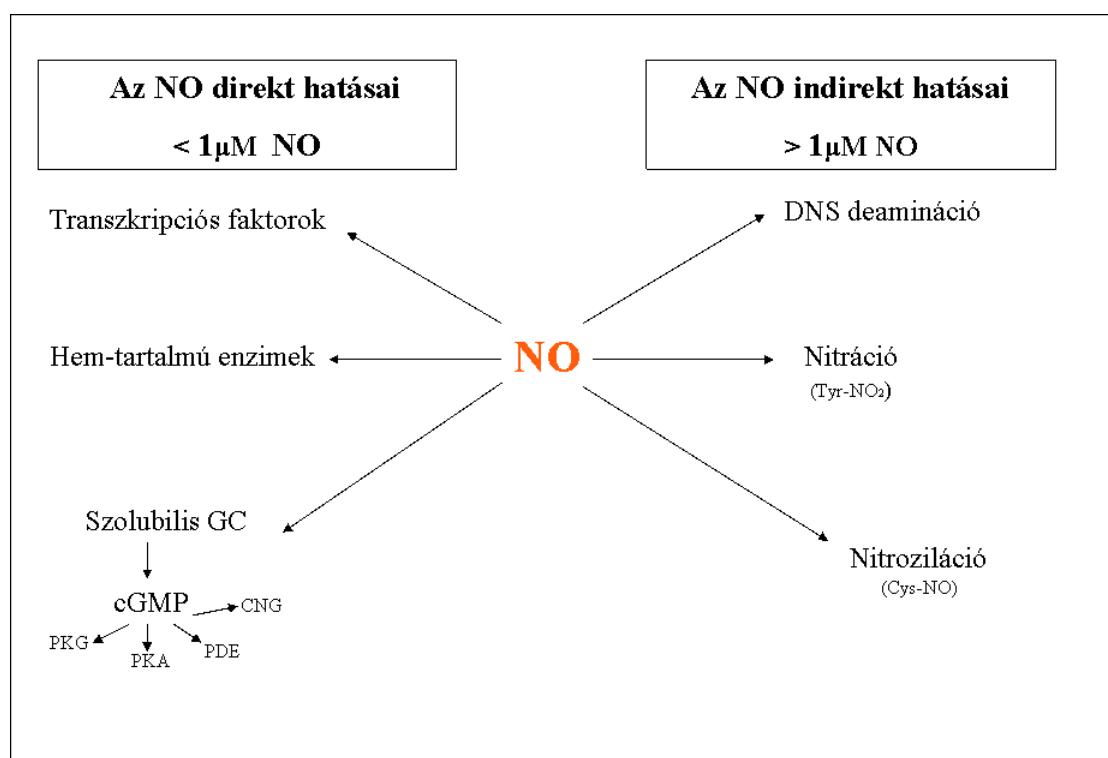
ne venne részt. Sokrétű biológiai hatását a nitrogén oxid fizikai és kémiai tulajdonságainak köszönheti.

### 2.3.2. Az NO fizikai és kémiai tulajdonságai

Szobahőmérsékleten, atmoszférikus nyomáson a nitrogén oxid ( $N = O$ ) szintelen, vízben kevésbé oldódó gáz. Hidrofóbicitásának és az ebből adódó magas diffúziós rátának köszönhetően a molekula még átalakulása előtt képes - biológiai rendszerekben - elérni célmolekuláját. Az NO vizes közegben közepesen reaktív, oxigénnel reagálva nitritet ( $NO_2^-$ ), nitrátot ( $NO_3^-$ ) képez. Átlagos féléletideje 3-6 s szövetekben, vérben 1-2 s (<http://www2.oakland.edu/oujournal/files/Malinski.pdf>). A nitrogén oxid, annak ellenére, hogy szabadgyök, relatíve stabil. A molekula stabilitása függ mindenkori koncentrációjától, a rendszer redox állapotától és a célmolekulák valamint a fémionok koncentrációjától. Elsősorban olyan molekulákkal lép reakcióba, melyeknek párosítatlan elektronja (elektronjai) van(nak), így tipikusan más szabadgyökökkel (pl.  $O_2^-$  - szuperoxid ion,  $OH^\cdot$  - hidroxil gyök) vagy átmeneti fémekkel, mint pl. a hem vas (hemoglobin, mioglobin, citokrómok). A nitrogén oxid reakciói *in vivo* és *in vitro* feltételek között különbözőek. *In vitro* rendszerekben a nitrogén oxid fő reakcióterméke a nitrit ( $NO_2^-$ ), míg *in vivo* a nitrát ( $NO_3^-$ ).

A nitrogén oxid hatása függ képződési helyétől és a képződött gáz mennyiségétől (3. ábra). Alacsony koncentrációban ( $< 1\mu M$  NO) (Wink,D.A. 1998) elsősorban a szolubilis guanilát ciklázal (sGC), a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szintéziséért felelős enzimmel lép kölcsönhatásba. Képes továbbá más enzimek és bizonyos transzkripció faktorok modulálására is. Magas koncentrációban ( $> 1\mu M$  NO) (Wink,D.A. 1998) a nitrogén oxid autooxidálódik, a végtermék ebben az esetben a

dinitrogén trioxid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ). Ez a vegyület az S-nitroziláció (nitrozotiol képződése fehérjék cistein aminosavain) fő mediátora. Ez a poszttranszlációs modifikáció sok esetben képes megváltoztatni az adott fehérje funkcióját (pl.  $\text{p21}^{\text{Ras}}$ ). Más esetben azonban, a nitrogén oxid szuperoxid anionnal ( $\text{O}_2^-$ ) reagálva peroxinitritet ( $\text{ONOO}^-$ ) hoz létre. A peroxinitrit, fehérjék tirozin aminosavával kölcsönhatva, nitrotirozint alkot. Ennek a poszttranszlációs modifikációnak szintén a fehérje funkciót módosító hatása van (pl. prosztaciklin szintáz).



**3. ábra. Az NO koncentrációtól függő hatása biológiai rendszerekben.** Alacsony,  $1\mu\text{M}$  alatti koncentrációban az NO közvetlenül lép kölcsönhatásba transzkripciós faktorokkal, hem-tartalmú enzimekkel és stabil Fe-nitrozil komplexet alakít ki átmeneti fém-tartalmazó fehérjékkel, mint amilyen a szolubilis guanilát cikláz (sGC). A sGC szerkezetében az NO vas-hemhez való kötődése olyan konformációs változást idéz elő, mely aktiválja az enzimet. Az aktív enzim a guanozin trifoszfát – ciklikus guanozin trifoszfát (cGMP) átalakítást katalizálja. A cGMP másodlagos hírvivőként cGMP függő kinázokat (PKA, PKG), cGMP foszfodiészterázt (PDE) vagy ciklikus nukleotid kapuzó ion csatornákat (CNG) aktivál. Magas,  $1\mu\text{M}$  lokális koncentráció felett az NO szuperoxiddal vagy oxigénnel reagálva

reaktív nitrogén oxid gyökök (RNOS) képez, így közvetve a DNS deaminációját, nitrációt vagy nitrozilációt okozhat.

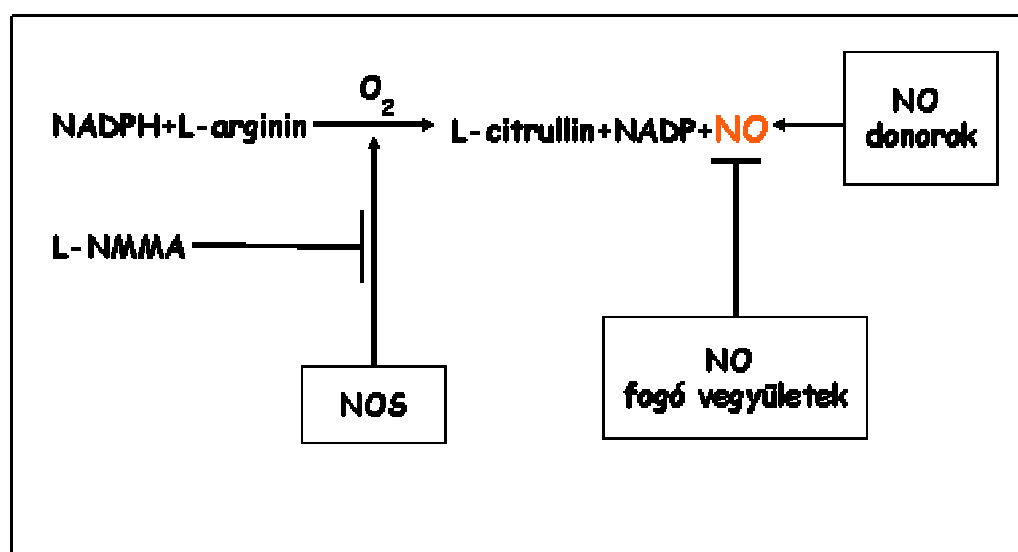
### 2.3.3. A nitrogén oxid képződése biológiai rendszerekben

#### 2.3.3.1. A nitrogén oxid képződésének enzimatikusan útjai

##### 2.3.3.1.1. A Nitrogén Oxid Szintáz (NOS)

###### A NOS izoformák

Állatokban elsősorban enzimatikusan úton, a hem proteinek családjába tartozó nitrogén oxid szintáz (NOS; EC 1.14.13.39) aktivitása által képződik nitrogén oxid. A NOS enzim oxigén és NADPH jelenlétében L-arginin-ből citrullin, NADP és nitrogén oxid képződését katalizálja (4. ábra). A reakció, így az NO koncentrációja NOS gátlószerekkel, NO fogó vegyületekkel és NO donorokkal befolyásolható. Maga az enzim szimmetrikus homodimer, működéséhez a következő kofaktorok jelenléte szükséges; FAD (flavin-adenin-dinukleotid), FMN (flavin-mononukleotid), tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), vas protoporfirin IX (hem), kalcium és kalmodulin.



4. ábra. A NOS által katalizált NO képződés sematikus rajza. Magyarázat a szövegben.

Az enzimet 1989-ben azonosították, majd 1991 és 1994 között három izoformáját klónozták és tisztították. A három 130 kDa molekulatömegű izoforma három különböző gén terméke, eltérő lokalizációval, regulációval, katalitikus tulajdonságokkal és inhibitor érzékenységgel rendelkezik. Az egyes típusú (NOS-I v. NOS-1) az ún. neuronális NOS (nNOS), mely elsősorban idegszövetekben expresszálódik, a kettes típusú (NOS-II v. NOS-2) az indukálható NOS (iNOS), mely sokféle sejtben és szövetben indukálható, míg a hármas típusú (NOS-III v. NOS-3) endotéliális NOS (eNOS) a vaszkuláris endotél szövetben található. Az elmúlt években mitokondriumból izoláltak egy negyedik típusúként jellemzett NOS-t is (mtNOS). Az eNOS és nNOS izoformák konstitutívan fejeződnek ki, aktiválódásukkor alacsony koncentrációban szabadul fel NO, míg az iNOS expressziója indukálható, hatására nagy mennyiségű nitrogén oxid képződik. A NOS katalitikus aktivitása hasonló a citokróm P450 monooxygenázok aktivitásához, C terminális doménje azonos a cyt P450 fehérjékével, így immunolokalizációja növényekben (melyek gazdagok citokróm P450 típusú enzimekben – *Arabidopsis thaliana* 273, *Homo sapiens* 128 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) - különösen nehéz.

### A NOS szabályozása

A NOS aktivitásának szabályozása több módon is lehetséges. A  $\text{Fe}^{2+}$ -NO komplexek stabilitása miatt, bármilyen enzim mely redukált vas-hem intermediert képez gátolható NO-val (Alderton, W.K. 2001). A NOS is ilyen enzim, tehát az általa képzett nitrogén oxid egy visszacsatolós mechanizmus útján képes szabályozni az enzim aktivitását. A nNOS és eNOS izoformák aktivitása  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM függő, teljes aktivitásukat 500 nM intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációnál éri el.  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM függőségük mellett a nNOS és eNOS izoformák foszforiláció által is szabályozhatóak. Az eNOS Ser<sup>1179</sup>

aminosaván történő, az Akt protein kináz általi foszforilációja növeli annak NO produkcióját (Dimmeler,S. 1999; Fulton,D. 1999), míg a nNOS CaM-dependens kináz általi foszforilációja a 847. szerinen csökkenti azt (Mccabe,T.J. 2000). A nNOS további regulátora a PIN („protein inhibitor of NOS”) fehérje, valamint a molekuláris chaperon Hsp90, mely az enzim allosztérikus modulátora (Alderton,W.K. 2001). A NOS enzimek lokalizációja ko- és poszttranszlációs modifikációval, mirisztóilációval ill. palmitóilációval szabályozható (Alderton,W.K. 2001; Patterson,S. 2002). Az eNOS lokalizációja meghatározott, kaveolákhoz (plazmalemma membrán mikrodomén) kötötten fordul elő endoteliális sejtekben.

#### NOS gátlószerek

A NOS inhibítorokat az enzimmel való kölcsönhatásuk helye, idő- és szubsztrát-függősége, valamint a gátlás mechanizmusa alapján különböztetjük meg. A kölcsönhatás helye alapján léteznek L-arginin kompetítorok, biopterin vagy hem kötőhelyen ható inhibítorok és flavoprotein vagy CaM inhibítorok. A legszélesebb körben használt NOS gátlószerek az L-arginin kompetítorok, mint például az L-NMMA (L-NG-monometil-L-arginin) (Alderton,W.K. 2001).

#### **2.3.3.1.2. A NO keletkezésének enzimatisz útjai növényekben**

Növényekben az NO enzimatisz keletkezésének jelenleg nyolc útja ismert (5.ábra).

| Forrás                                                    | Referencia                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Durva extraktum és sejt organelumok (NOS-szerű aktivitás) | Sen & Cheema (1995); Cueto és mtsai. (1996); Ninnemann & Maier (1996); Delledonne és mtsai. (1998); Durner és mtsai. (1998); Ribeiro és mtsai. (1999); Barroso és mtsai. (1999); Modolo és mtsai. (2002) |
| <i>Arabidopsis</i> protein (AtNOS1)                       | Guo és mtsai. (2003)                                                                                                                                                                                     |
| Nitrát redukáz                                            | Yamasaki és mtsai. (1999)                                                                                                                                                                                |
| Xantin oxidoredukáz                                       | Millar és mtsai. (1998); Harrison (2002)                                                                                                                                                                 |
| Torma peroxidáz                                           | Boucher és mtsai. (1992b); Huang és mtsai. (2002)                                                                                                                                                        |
| Citokróm P450                                             | Boucher és mtsai. (1992a); Mansuy & Boucher (2002)                                                                                                                                                       |
| Hem proteinek                                             | Boucher és mtsai. (1992b)                                                                                                                                                                                |
| Azonosítatlan plazma membrán-kötött enzim                 | Stöhr és mtsai. (2001)                                                                                                                                                                                   |

5. ábra. Az NO keletkezésének enzimatisz utjai növényekben.

Ezeket három kategóriába sorolhatjuk; **arginin-mediált** (L-arginin, O<sub>2</sub> és kofaktor függő), **nitrit-mediált** (nitrit és NAD(P)H függő, O<sub>2</sub> jelenlétében és annak hiányában is működik) és **egyéb alternatív** utakra.

#### Arginin-mediált út

Az utóbbi években jónéhány kutató tett nagy erőfeszítéseket annak érdekében, hogy egy az emlőskéhez hasonló, növényekben előforduló NOS izoformát izoláljon. Néhány közlemény NOS-szerű aktivitásról számolt be biokémiai megközelítések eredményeként ill. NOS gátlószerekre kapott érzékenység vagy emlős NOS ellenanyagokkal végzett keresztreakciók alapján, különböző növényi extraktumokban és organelumokban (Cueto, M. 1996; Ninnemann, H. 1996; Delledonne, M. 1998; Durner, J. 1998; Ribeiro, E.A. 1999; Barroso, J.B. 1999; Modolo, L.V. 2002). Azonban még az *Arabidopsis* genom ismertté válása („The Arabidopsis genome initiative, 2000”) után sem sikerült az emlős NOS-okkal nagy szekvencia hasonlóságot mutató gént vagy

proteint azonosítani. Így még nagyobb hangsúlyt kapott az a kérdés, hogy növényekben milyen egyéb úton/utakon keletkezik/keletkezhet NO.

Guo és munkatársai 2003 októberében a Science című lap hasábjain egy Arabidopsis NOS gén (*AtNOS1*) jelenlétéről tudósítottak (Guo,F.Q. 2003). A gén által kódolt és megtisztított AtNOS1 fehérjéről kimutatták, hogy szubsztrátjai az arginin és nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH) és a protein  $\text{Ca}^{2+}$ -al és CaM-al aktiválható, hasonlóan az emlős eNOS-hoz és nNOS-hoz, de azokhoz nem mutat szekvencia homológiát. A fehérje NO-ot termel és részt vesz a növény növekedésének és hormonális szignalizációjának szabályozásában. Meglepő módon az AtNOS1 fehérje szekvenciája nagy hasonlóságot mutatott egy bakteriális, feltételezett GTP-kötő (guanidin trifoszfát-kötő) vagy GTPáz (guanidin trifoszfátáz) domént tartalmazó fehérje csoporttal és ugyancsak nagy homológiát mutat a *Helix pomatia* NOS-val, mely egy új típusú NOS (Zemojtel,T. 2004). A GTPáz és NOS domén együttes jelenléte egy fehérjén feltételezi e két alapvető szignalizációs mechanizmus összekapcsolódásának lehetőségét. Ez utóbbi feltételezést támasztják alá azok a publikációk, melyek a GTPáz-alapú jelátviteli folyamat és az NO kapcsolatát írják le emlősökben (Friebe,A. 2003; Sauzeau,V. 2003; Witteck,A. 2003).

### Nitrit-mediált út

A nitrogén oxid keletkezésének másik enzimatis, nitrit-mediált módja megvalósulhat nitrát reduktáz (NR, EC 1.6.6.1), nitrit-nitrogén oxid reduktáz (Ni-NOR, EC 1.7.2.1) ill. a 2-es típusú hemoglobinok (Hb2) által, valamint a mitokondriumban egy máig ismeretlen mechanizmus útján.

A nitrát a növények fő nitrogén forrása és egyben fontos szignalizációs molekula, mely befolyásolja a növényi szervezet növekedését és differenciációját. A



nitrát asszimiláció első lépése a nitrát nitritté redukálása. A reakciót a NR katalizálja. Régóta ismert tény, hogy a NR bizonyos körülmények között képes a nitrit NO-vá történő redukciójára NAD(P)H-függő módon (Klepper, L.A. 1987; Harper, J.E. 1981; Rockel, P. 2002; Yamasaki, 2000b). Anoxiás állapotban az NO emisszió mértéke korrelál a nitrit koncentrációval és a NR aktivációjával (Rockel, P. 2002; Kaiser, W.M. 2002; Morot-Gaudry-Talarmin, Y. 2002; Lillo, C. 2004). Aerob körülmények között az NO emisszió alacsony (általában kisebb, mint  $0.5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ ), anoxia esetén sötétben viszont az emissziós érték akár az előbbi háromezeresére is emelkedhet ( $150 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ ) (Rockel, P. 2002; Crawford, N.M. 2005). A NR nitrit és NADH jelenlétében bekövetkező NO termelése csak elenyésző (1%) hányadát teszi ki az enzim teljes nitrát redukáló kapacitásának. A NR NO-t generáló szerepe azonban még nem teljesen tisztázott. Garcia-Mata és mtsai. szerint a NR generálta NO-nak az ABS-indukált gázcserenyílás záródásban van szerepe (Garcia-Mata, C. 2003). Ezt a feltevést mintegy megerősíti, hogy egy Arabidopsis NR mutáns (NR dupla mutáns alacsony, de detektálható NR aktivitással) vizsgálata közben kiderült, az ABS-indukálta NO szintézis és a gázcserenyílás záródásának szükséges feltétele a NR aktivitása (Desikan, R. 2002). Az irodalmi adatok e tekintetben nem vágnak egybe, hiszen vannak esetek, amikor nem áll nitrát a növény rendelkezésére (Raven, J.A. 2003). Így jogosan merül fel a kérdés: hogyan függhet egy olyan alapvető folyamat, mint a gázcserenyílás záródása, egy olyan szignáltól, melynek szintézise nitrát-dependens? Ezt nehéz elképzelni. Sokkal valószínűbb, hogy a NR csak egy, a számtalan lehetséges NO forrás közül.

Állatokban és egysejtű algákban a mitokondrium is részt vesz a nitrit NO-vá történő redukálásában (Kozlov, A.V. 1999; Tischner, R. 2004). Dohány szuszpenzióból tisztított mitokondrium ugyancsak képes NO termelésre NADH jelenlétében, anoxiás körülmények között, de aerob környezetben nem (Planchet, E. 2005). Egy igen érdekes,

nemrég napvilágot látott publikáció pedig arról számol be, hogy csak a gyökérből izolált mitokondrium redukálja a nitritet NO-vá *in vitro* és *in situ*, a levélből izolált nem (Gupta,K.J. 2005). A gyökér és levél eredetű mitokondriumok különböző nitrit redukáló kapacitása általánosnak tűnik a magasabb rendű növények körében, hiszen a kísérleteket *Arabidopsis* mellett elvégezték árpan, borsón és dohányon is. A szerzők úgy vélik, a levél mitokondrium nitrit redukálásának hiánya összefügghet a fotoszintézissel. Ennek igazolásához azonban további kísérletek elvégzésére van szükség.

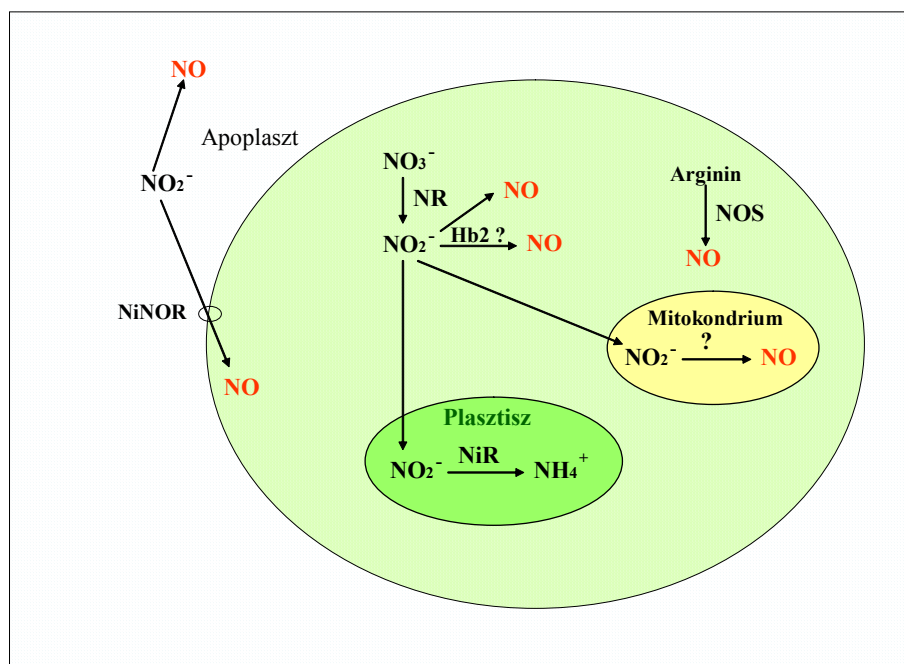
Egy 310 kDa nagyságú, plazma membrán-kötött enzimről (Ni-NO reduktáz) is kiderült, hogy nitritből képes NO képződését katalizálni dohány gyökérben (Stohr,C. 2001). Az enzim funkciója ezidáig ismeretlen. Ezen kívül, úgy tűnik, hogy a hemproteinek, mint pl. a 2-es típusú hemoglobinok (Hb2) is ideális jelöltek az NO enzimatisz termeléséhez N-hidroxiarginin (NOHA) jelenlétében (Crawford,N.M. 2005).

### Egyéb alternatív utak

Az NO keletkezésének léteznek más alternatív útjai is növényi szervezetekben. A torma peroxidáz hidroxürea és hidrogén peroxid jelenlétében képes NO-t termelni (Huang,J.M. 2002). Egyéb, számításba vehető enzimatisz NO forrás a xantin oxidoreduktáz (XOR, EC 1.17.1.4) és a citokróm P450 (CPR, 1.6.2.4) (Boucher,J.L. 1992; Millar,T.M. 1998; Harrison,R. 2002; Mansuy,D. 2002). Mindezeket összevetve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az enzimatisz úton történő NO képződés, legyen az konstitutív vagy biotikus/abiotikus stressz által indukált, jóval gyakoribb esemény, mint azt idáig feltételeztük. Valószínűsíthető, hogy a növényi sejtek nem egy és kizárólagos enzimatisz, nitrogén oxidot szintetizáló folyamattal rendelkeznek, hanem sokkomponensű NO-t generáló rendszerrel.

### 2.3.3.2. Az NO képződésének nem enzimatikus útja növényekben

Az NO nem enzimatikus képződése nitrogén oxidok és növényi metabolitok kémiai reakcióinak, dinitrogén oxid lebomlásának vagy a nitrit savas pH-án való kémiai reakciójának eredménye (Nishimura,H. 1986; Klepper,L. 1991). A savas környezet a nitrit protonálódási reakciójának kedvez, melynek során bizonyos körülmények között NO keletkezhet (Bethke,P.C. 2004). Redukáló ágensek, mint például az aszkorbin sav és néhány fenolos vegyület, felgyorsítják a fenti reakciót (Yamasaki,H. 2000b). A jelenséget árpa aleuron sejtek apoplastjában mutatták ki gibberelin sav és abszcizin sav hatására. Mindkét hormon savanyítja az apoplast pH-ját, mintegy indukálva a protonálódási reakciót. Az NO képződésének lehetséges útjait növényekben a 6. ábra foglalja össze.



**6. ábra.** Vázlatos diagramm az eddig ismert nitrit és arginin-mediált NO-t szintetizáló növényi mechanizmusokról.

A nitrit NO-vá történő redukciója az apoplastban nem enzimatikus úton megy végbe, míg a plazma membránban a nitrit-nitrogén oxid reduktáz ( $\text{NiNOR}$ ), a citoszólban pedig a nitrát reduktáz ( $\text{NR}$ ) által

valósul meg. Feltételezhetően a 2-es típusú hemoglobinok (Hb<sub>2</sub>) is részt vesznek a citoszolikus NO szintézisben. A mitokondriumban ismeretlen mechanizmus útján keletkezik a nitrogén oxid.

#### 2.3.4. Az NO donorokról

Növényi szervezetek NO kezelése és ennek következményeként egy bizonyos válasz kiváltása még nem jelenti okvetlenül, hogy az endogén módon keletkezett NO is ugyanazt a fejlődési vagy fiziológiai folyamatot eredményezi. Éppen úgy, ahogy a hormonok esetében bizonyos kritériumok egyidejű megléte szükséges ahhoz, hogy egy válaszreakció kiváltását kétségtelenül az endogén NO felszabadulásnak tulajdonítsuk. Ezek a kritériumok a következők; a válasz NO kezeléssel történő kiváltása, ugyanezen válasz megszűnése az NO szintézisének kémiai vagy genetikai gátlásával, a válasz elmaradása az NO rendszerből való eltávolítása esetén [NO fogók („scavenger”) alkalmazása]] és a válasz NO szintézis és/vagy koncentráció függésének kimutatása.

A gyakorlatban az NO kezelés NO donor használatát jelenti, mely valamilyen NO felszabadulást eredményező kémiai anyag. Ez a megközelítés technikailag jóval egyszerűbb, mint az NO gáz alkalmazása. A kémiai NO donorok hat osztályát különböztetjük meg; S-nitrozotiolok (RSNO), organikus nitrátok (glicerín-trinitrát), vas – nitrozil komplexek (SNP), szidonimineket (morfolin származékok), C-nitrozó vegyületek (C-NO) és másodlagos aminos – NO komplexek (amin NONOát) (Al Sa'doni, H. 2000). Az egyik legáltalánosabban használt NO donor a nátrium nitroprusszid (SNP). Valójában a SNP nitrozónium ion (NO<sup>+</sup>) donor és oldatban nitroziláló elektrofil gyökként viselkedik (Al Sa'doni, H. 2000). Fény hatására bekövetkező bomlására alkalmazása esetén ügyelnünk kell. Annak érdekében hogy a kísérleteinkben tapasztalt NO hatást valójában az NO felszabadulása és nem pusztán a

kémiai donor vagy egyéb bomlástermék jelenléte váltja ki, célszerű több donort is használni.

### 2.3.5. Nitrogén oxid kimutatása növényekben

Az NO detektálására számos módszert fejlesztettek ki, ezeket alapvetően megközelítésük (direkt vagy indirekt) és detektálási küszöbértékük alapján különböztetjük meg (Packer,L. 1995). NO emisszió direkt módon megbecsülhető gázkromatográfiával, tömegspektrometriával, kemilumineszcens meghatározással, lézer fotoakusztikus spektroszkópiával és oldatban NO-szelektív elektróddal is (Packer,L. 1995). NO jelenléte indirekt módon olyan molekulákkal is kimutatható, melyekkel az NO *in vivo* is reakcióba lép és ami spektrálisan kimutatható elváltozást okoz a kölcsönható partneren, ilyen például a hemoglobin. A hemoglobin módszer lényege, hogy az oxihemoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) NO általi oxidációja methemoglobinná (MetHb) nyomon követhető az oxidált forma spektrumának felvételével. A módszer hátulütője, hogy a  $\text{HbO}_2$  reaktív oxigén gyökökkel és nitrittel is kölcsönhatásba léphet. Az indirekt megközelítések közül talán a Griess reakción alapuló technika az egyik legelterjedtebb. A Griess reakció az NO vizes oldatban keletkező stabil reakciótermékét, a nitritet mutatja ki (Devignat,R. 1952). A módszer növényi szövetekben való alkalmazását, azok magas nitrit tartalma módfelett megnehezíti. Az NO, mint szabadgyök kimutatása lehetséges továbbá elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiával is. Ebben az esetben különféle ún. spin csapdákkal kötik meg a vizsgált rendszerben található NO-t.

1998-ban Kojima és munkatársai egy új fluorofór család, a diaminofluoreszceinek (DAF) megalkotásáról számoltak be (Kojima,H. 1998). Ezzel

egy új, az NO *in vivo* kimutatására alkalmas eszközt adtak a nitrogén oxid kutatással foglalkozó szakemberek kezébe, ami növényekben máig a legszélesebb körben elterjedt NO detektálási módszer. A diaminofluoreszceinek a fluoreszceinek családjába tartoznak, legfőbb tulajdonságuk, hogy alapállapotban nem, viszont az NO és O<sub>2</sub> reakciójából származó dinitrogén trioxiddal (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) reagálva erősen fluoreszkálnak. NO iránti érzékenyséjük igen nagy, kb. 2-5 nM. Létezik egy sejtpерmeábilis változatuk is (DAF-DA), ebben az esetben a DAF molekulához acetát csoportokat kötnék észterezésével, így a molekula képes a sejtmembránon keresztül a citoszólba jutni, ahol nem specifikus észterázok hasítva az észterkötést NO (vagyis inkább N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kötésre alkalmas állapotba hozzák, az immár a citoplazmában rekedt fluorofór komplexet.

Az elmúlt időszakban sok felhasználóban kétségek merültek fel a DAF NO specifikitása iránt. Zhang és munkatársai bebizonyították, hogy a dehidroaskorbin és az askorbin sav is képes a DAF-al fluoreszkáló komplexet létrehozni (Zhang, X. 2002). Jourdeuil pedig bemutatta, hogy a DAF fluoreszcenciája peroxinitrit vagy peroxidázok jelenlétében növelhető (Jourdeuil, D. 2002), Espey és munkatársai ugyanezt demonstrálták nitroxil ion esetén (Espey, M.G. 2002). Mindhárom eset a DAF megbízhatóságának, mintsem az NO képződésének megkérdőjelezésére mutat rá. Ezenkívül a N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> megkötésével a celluláris antioxidánsok, mint a redukált glutation vagy az askorbát csökkenthetik a DAF fluoreszcencia intenzitását.

### 2.3.6. Nitrogén oxid fiziológiai hatásai növényekben

Növényekben a nitrogén oxid fiziológiai hatásai szerteágazóak; **fejlődés szabályozó**, elsődleges szignalizációs molekulák, a **hormonok hatását befolyásolja**, közreműködik a **programozott sejthalál (PCD)** és az **abiotikus stressz válasz**

kialakításában, valamint a **betegségekkel szembeni védekezés regulátora** (Neill,S.J. 2003).

#### 2.3.6.1. NO, mint növekedés és fejlődés szabályozó

Régóta ismert tény, hogy a magasabb rendű növények NO-t bocsájtanak ki környezetükbe (Wildt,J. 1997), ami az autók kipufogójából és az erőművekből származó nitrogén oxidokkal együtt az atmoszférában halmozódik fel. Ez az úgynevezett biomassza füst. A biomassza füst nitrogén oxidjai igen hatékonyak nyugalmi állapotban lévő magvak csírázásának serkentésében (Keeley,J.E. 1997). Mára tucatnyi olyan fajt ismerünk világszerte, melyek csírázásához ez a „füst” szükséges és jónéhány „füst” komponenst azonosítottak potenciális csírázásserkentőként, köztük a nitrogén oxidot is. Az NO megtöri a magvak nyugalmi állapotát és serkenti csírázásukat Arabidopsisban, salátában és búzában is (Bethke,P.C. 2004; Zhang,H. 2005; Beligni,M.V. 2000). Ezenkívül, EPR analízissel endogén NO felhalmozódást mutattak ki csírázó cirok magvakban (Simontacchi,M. 2004). A csírázás során fellépő heves NO termelés összefüggésbe hozható nitrát reduktáz és NOS-szerű aktivitásokkal, de az NO nem enzimatis, apoplaszt savanyodásra történő produkciója sem kizárt (Bethke,P.C. 2004). Az NO csírázásra gyakorolt hatásának egy további lehetséges mechanizmusa a  $\beta$ -amiláz aktiválásával magyarázható. A  $\beta$ -amiláz, melynek különösen fontos szerepe van a csírázás korai szakaszában NO-val indukálható (Zhang,H. 2005). Az NO germinációra gyakorolt hatásának pontos leírása a jövő feladata.

Már az 1979-es megfigyelések beszámolnak az NO kezelésnek a növények növekedésére gyakorolt hatásáról. Magas (40-80 pphm, „parts per hundred million”) NO koncentráció gátolta, míg alacsony (1-20 pphm) serkentette a paradicsom

növekedését (Anderson,L.S. 1979). Későbbiekben ugyanezt a kísérletet salátán és borsón megismételve hasonló eredményt kaptak (Hufton,C.A. 1996; Leshem,Y.Y. 1996). Az NO-nak a fotoszintetikus apparátusra is van hatása, reverzibilisen gátolja az elektron transzportot, így az ATP szintézist, a színtestekben (Takahashi,S. 2002). Tételezzük fel, hogy a nitrit az NO forrás, így ha nem áll elég nitrit a növény rendelkezésére és/vagy csökken a nitrit reduktáz nitrit redukáló képessége, a nitrát reduktáz NO termelése megnő és a nagy mennyiségben keletkezett NO gátolja a fotoszintézist, így a növény növekedése lelassul. Ezt a feltételezést támasztja alá Morot-Gaudry-Talarmain és munkatársai azon megfigyelésükkel, miszerint nitrit-reduktáz antiszensz dohányban NO akkumulációról és csökkent növekedésről számolnak be (Morot-Gaudry-Talarmain,Y. 2002).

NO donorok gátolják a hipokotil és az internódusz megnyúlását, stimulálják a de-etiolációt és növelik a klorofill tartalmat burgonyában, salátában és Arabidopsisban (Beligni,M.V. 2000). Borsó levelekben, kiváltképpen a gázcsereenyílás sejtjeiben, az NO ugyancsak növeli a klorofill koncentrációját (Leshem,Y.Y. 1997). Az NO klorofillra gyakorolt hatása a vas homeosztázisban vállalt szerepével hozható összefüggésbe. A vas hiány okozta klorózis kialakulása NO donorokkal megakadályozható (Graziano,M. 2002).

Néhány beszámoló szerint az NO-nak öregedést gátló hatása is van. Borsóban például öregedést serkentő körülmények között NO donorok alkalmazásával meg tudták akadályozni az etilén (öregedést kiváltó hormon) bioszintézisét (Leshem,Y.Y. 1996). Másrészt viszont némileg ellentmondva ennek, Arabidopsis növények NO gázzal történő kezelése során megemelkedett etilén koncentrációt mértek (Magalhaes,JR. 2000). Az NO virág öregedést késleltető hatása azonban egyértelműen bizonyított vágott virágokon, NO donorok alkalmazásával (Leshem Y. 2001). A gyümölcs érése a



másik etilén indukált és NO által modulált öregedéssel kapcsolatos folyamat. Éró gyümölcsökben, pl. banán vagy eper esetében a növekvő etilén koncentráció jól korrelál a csökkenő NO emisszióval (Leshem, Y.Y. 2000). Emellett NO kezeléssel zöldségek és gyümölcsök betakarítás utáni tárolhatóságának ideje meghosszabítható (Neill, S.J. 2003).

Gyökerekben a nitrogén oxid az auxin jelátviteli úttal együttműködve járulékos oldalgyökérképződést indukál, cGMP függő és cGMP független módon is (Pagnussat, G. 2002). A cGMP független út a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) kaskád aktiválásán keresztül hat (Pagnussat, G. 2004). Kukoricában a gyökér megnyúlásában is szerepet tulajdonítanak az NO-nak (Gouvea, C.M.C.P. 1997).

Az endogén NO szintjének csökkenése meghatározhatja a vegetatív állapotból reprodukív állapotba történő fázisváltást. Endogén koncentrációjának emelkedése gátolja a virágzást és befolyásolja a virágzáskor kifejeződő gének expresszióját (He, Y.K. 2004). Megtermékenyítéskor, a pollencső növekedését segíti a bibén (Prado, A.M. 2004). Ha a pollencső csúcsi részében nem halmozódik fel NO, az tovább nő, míg az NO (cGMP függő) keletkezése növekedésgátlást okoz. Tehát az NO pollencső csúcsában való eloszlása meghatározza a pollencső növekedésének irányát. Egy ehhez feltűnően hasonló jelenséget gyökérben is leírtak. Gravitrópikus szignál auxin függő módon asszimmetrikus, cGMP függő NO felhalmozódást okoz a horizontális gyökér alsó részén, mely gravitrópus elhajláshoz vezet szójában (Hu, X.Y. 2005).

Az NO előzőekben hosszasan ecsetelt, a növények növekedésében és fejlődésében betöltött szerepe miatt, e sokoldalú molekulát tekinthetjük egy nem hagyományos növekedési regulátornak, hormonnak is (Beligni, M.V. 2001).

### 2.3.6.2. Az NO és a klasszikus fitohormonok kapcsolata

Mint korábban említettük, az NO az auxin jelátviteli úttal együttműködik és olyan alapvető élettani folyamatokat befolyásol, mint a járulékos oldalgyökérképződés vagy a gyökér megnyúlásos növekedése. A szignáltranszdukciós utak közös pontjairól és pontos molekuláris mechanizmusáról azonban sajnos nincsenek adataink. Mint ahogy arról sincsenek, hogy az NO részt vesz-e egyéb, auxin indukált fiziológiai válaszok kialakításában. Jelen dolgozatunk ebből a szempontból hiánypótló, hiszen a hamarosan ismertetésre kerülő eredmények azt bizonyítják, hogy az NO auxin függő módon befolyásolja lucerna mezofil sejtek de- ill. redifferenciációját.

A felfedezés, miszerint az NO részt vesz az ABS indukált gázcsereenyílás záródásban, szép példája az NO és a vele kölcsönható növényi hormon együttműködésének. A gázcsereenyílás állapotát a tonoplaszton és a plazma membránon keresztül áramló víz ozmotikus fluxusa határozza meg. A víz áramlása mindig passzívan követi a  $K^+$  és  $Cl^-$  ionok specifikus ion csatornákon keresztül megvalósuló mozgását. A  $K^+$  és  $Cl^-$  ioncsatornákat különféle stimulusok, mint például az ABS, aktiválják vagy deaktiválják (Schroeder, J.I. 2001). A gázcsereenyílás zárósejtjeiben adekvát ingerre bekövetkező jelátviteli út meglehetősen bonyolult,  $Ca^{2+}$  osszcilláción alapuló jelrendszer (Schroeder, J.I. 2001). A  $Ca^{2+}$  osszcillációt olyan szignalizációs molekulák váltják ki, mint az  $IP_3$ , az  $SIP$ , a  $H_2O_2$  és a cADPR (Hetherington, A.M. 2001). Az ABS gyors, NO emissziót okoz borsó gázcsereenyílás zárósejtjeiben (Neill, S.J. 2002). Hasonló jelenséget azóta babban (Garcia-Mata, C. 2002) és Arabidopsisban is (Desikan, R. 2002) megfigyeltek. A hatás szövetspecifikus, Arabidopsis szuszpenzióban nem indukál az ABS NO választ (Tun, N.N. 2001). Borsóban és Arabidopsisban az NO szükséges feltétele az ABS indukált gázcsereenyílás záródásának, borsóban az NO forrás valószínűleg a NOS (Neill, S.J. 2002),

Arabidopsisban pedig a NR (Desikan,R. 2002). Úgy tűnik, hogy az NO forrás tekintetében faj specifitás figyelhető meg, legalábbis a gázcsere nyílás zárósejtjeiben.

A citokininekről is bebizonyosodott, hogy NO szintézist indukálhatnak dohányban, petrezselyemben és Arabidopsisban (Tun,N.N. 2001). Igen érdekes továbbá, hogy NO donorok citokinin hatást mimikálnak és a citokinin indukált betalain felhalmozódás NOS gátlószerekkel megakadályozható (Scherer,G.F.E. 2000). Itt utalnánk arra a megállapításra, hogy a citokinin receptorok ligand kötő alegysége (CHASE) funkcionális hasonlóságot mutat az NO kötésre alkalmas vas alapú szenzor fehérjék egyik alegységével (HNOB) (Anantharaman,V. 2001), ami felveti a citokinin receptorok NO-t kötő képességének lehetőségét. A citokinin és az NO jelátviteli út a programozott sejthalál indukálásában is összekapcsolódik. Újabb kutatások szerint, a citokinineknek az NO indukált programozott sejthalálban is szerepük van (Carimi,F. 2003; Carimi,F. 2005).

Az etilén és az NO kapcsolatáról korábban már tettünk említést (lásd 2.3.6.1. fejezet).

### **2.3.6.3. NO és a programozott sejthalál**

A programozott sejthalál (PCD) egy genetikailag meghatározott, metabolikusan irányított sejtszintű folyamat, mely az érintett sejt öngyilkosságával végződik. A programozott sejthalál tehát belső szignalizációs utak és kivégző mechanizmusok eredménye, nem pedig valamilyen sérülés hatására bekövetkező nekrotikus folyamat. A hiperszenzitív reakció (HR) gyakran PCD-ban zárul. A folyamathoz a nitrogén oxid is hozzájárul. Arabidopsis sejtkultúra avirulens patogénnel történő kezelése NO felszabaduláshoz vezet (Clarke,A. 2000). Az NO által indukált PCD-ra is jellemző a

kromatin kondenzáció és a kaszpáz-szerű kaszkád aktiválása. Habár kaszpázok létezésére nincs egyértelmű bizonyíték növényekben, metakaspázok léteznek, kaszpáz-szerű funkcióval. Szója sejt kultúrában az NO egyedül nem idéz elő PCD-t, inkább az NO:szuperoxid arány határozza meg a sejt további sorsát (Delledonne, M. 2001). Ha a szuperoxid koncentrációja magasabb, a nitrogén oxid szuperoxiddal hat kölcsön peroxinitrit képződése közben, ami nem indukál PCD-t. Ellenkező esetben, magasabb NO koncentrációnál a nitrogén oxid a szuperoxid diszmutációjából keletkezett hidrogén peroxiddal kölcsönhatva beindítja a PCD folyamatát.

A hormonok indukálta fejlődési szakaszokban megfigyelhető PCD-ban, az NO-nak antioxidáns szerep jut. Árpa aleuron rétegben, gibberelin sav (GS) hatására bekövetkező PCD NO kezeléssel késleltethető (Beligni, M.V. 2002). Mivel az NO nem gátolja a GS aktivált  $\alpha$ -amiláz aktivitását és expresszióját sem, az NO ebben az esetben specifikus endogén PCD regulátornak tekinthető.

Mechanikai stressz okozta PCD-ban is szerepet játszik az NO. *Kalanchoe daigremontiana* levelek és kallusz sejtek centrifugálása NO szintézist indukált, ami a DNS fragmentálódásához, így sejthalálhoz vezet (Pedroso, M.C. 2000). A jelenség NOS inhibitorokkal kivédhető, így a keletkezett NO feltételezhetően NOS-szerű aktivitásnak köszönhető. Arabidopsisban is tapasztalható hasonló (Garces, H. 2001).

Újabb megfigyelések a xilém és floém differenciációjában taglalják a nitrogén oxid szerepét. Azon sejtek, melyek ráléptek a xilém elemmé differencionálódás útjára, nagy mennyiségű NO-t termelnek, mindaddig, míg ki nem alakul az immár terminálisan differencionált sejt másodlagos sejtfala és be nem következik a sejt autolízise (Gabaldon, C. 2005).

Állatokban és növényekben is a PCD és a mitokondriális funkcióváltás jól korrelál egymással. Arabidopsis sejtekben az NO indukált PCD a mitokondriális légzés

gátlása és a citokróm c kilökődése révén valósul meg (Zottini,M. 2002), ami jól jelzi a PCD konzerváltságát eukarióta rendszerekben.

#### **2.3.6.4. Az NO és az abiotikus stresszválasz**

Jól ismert tény, hogy jónéhány abiotikus stresszor, a szárazság, alacsony és magas hőmérséklet, UV és ózon hatására reaktív oxigén gyökök (ROS, „reactive oxygen species”) termelését indukálja (Neill,S.J. 2003). Amellett, hogy a ROS romboló erejű oxidatív folyamatokat idéz elő, különféle jelátviteli utakat is aktivál. Az NO változatos módon lép reakcióba a ROS-al. Koncentrációtól függő módon lehet antioxidáns, vagy citotoxikus hatású.

A szárazság stressz az egyik legnagyobb környezeti fenyegetés, ami alapvetően befolyásolja termesztett gabonanövényeink terméshozamát. Megérteni a szárazság stressz által előidézett sejtszintű folyamatokat kulcsfontosságú az ellene való védekezési stratégiák kidolgozásához. A szárazság közvetlenül a növények vízháztartását érinti a csökkenő turgornyomás ABS szintézist indukál, ami a gázcsere nyílás zárósejtjeiben NO termelést okoz. Borsóban a hervadás megemelkedett NO emissziót idéz elő (Leshem,Y.Y. 1996). Arabidopsisban ennek pont az ellenkezőjét figyelték meg (Magalhaes,JR. 2000). Ezt az ellentmondást faji különbségek is magyarázhatják, de tisztában kell lennünk a vízvesztés egyéb paramétereivel is (pl. vízpotenciál). Az viszont kétségtelen, hogy NO donorok alkalmazása csökkentve a gázcsere nyílások átmérőjét, a transpiráció mérséklődését okozza (Mata,C.G. 2001). Az NO minden bizonnyal nem egyedül, hanem más szignalizációs molekulákkal pl. hidrogén peroxiddal együtt gázcsere nyílás záródást idézi elő, úgy hogy aktiválja az ABS bioszintézisét (Zhao,Z.G. 2001).

A magas vagy alacsony hőmérséklet által indukált stresszel is kapcsolatba hozható a nitrogén oxid. Rövid időtartamú magas hőmérséklet NO felszabaduláshoz vezetett lucernában (Leshem,Y. 2001), NO kezeléssel rezisztencia váltható ki fagyás ellen paradicsomban, búzában és kukoricában (Lamattina,L. 2001). Minden bizonnyal a nitrogén oxid antioxidáns hatása akadályozza meg a fagyás vagy a magas hőmérséklet során keletkezett ROS felhalmozódását.

NO donorok és NOS gátlószerek használatával kimutatható, hogy NOS-szerű aktivitástól függő módon képes az NO aktiválni az UV-B indukált CHS expresszióját (Mackerness,S.A.H. 2001). Habár a nitrogén oxid UV stresszben játszott szerepe nem tisztázott, UV-B besugárzás előtti NO kezelés 50%-al növelte az egészséges levelek számát burgonyában (Lamattina,L. 2001).

Egy másik légszennyező molekula, az ózon is kölcsönhat NO-al. Ózon kezelésnek kitett Arabidopsis növényekben NOS aktivitás mutatható ki (Rao,M.V. 2001). Dohányban hasonló körülmények között az NO szalicil sav szintézist indukált (Durner,K. 1998). Tovább bővíti a felsorolást az a megfigyelés, miszerint az NO kezelés megnövelte az ózon indukált etilén termelést (Rao,M.V. 2001).

A sebzés a patogén támadás gyakori kísérője, a folyamat természetes velejárója NO és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felszabadulás (Delledonne,M. 1998). A sebzés önmagában nem szabadít fel NO-t, az a patogenézis során keletkezik.

#### **2.3.6.5. Az NO a betegségekkel szembeni védekezés modulátora**

Az NO-nak kulcsszerepet tulajdonítanak a hiperszenzitív reakció kiváltásában (Delledonne,M. 1998; Durner,K. 1998). A HR együttjár reaktív oxigén gyökök keletkezésével, a programozott sejthalál elindulásával és a védekezésben közreműködő

gének (pl. PAL, CHS) expressziójának aktiválódásával. A HR lokalizált sejthalált eredményez, így akadályozza meg a növényi szervezet a patogén tovaterjedését. Szója sejtkultúra avirulens (HR-t indukáló) patogénnel való kezelése gyors NO és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felszabaduláshoz vezet (Delledonne, M. 1998). Baktérium kórokozó által kiváltott sejthalál és a PAL gén expressziója egyaránt blokkolható NOS inhibitorokkal. A patogén-indukált NO tehát NOS aktivitás eredménye és a keletkezett nitrogén oxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val kölcsönhatva HR-t indukál. A szalicil sav a szisztémásan szerzett rezisztencia (SAR) kialakításában nélkülözhetetlen szignalizációs molekula (Draper, J. 1997). Minthogy dohányban az NO elősegíti a SA szintézisét, a szalicil sav, a nitrogén oxid és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alighanem egy komplex szignalizációs hálózatot alkotnak a HR reakció kialakulása során (Van Camp, W. 1998; Song, F.M. 2001).

A fitoalexinek szintézise egy másik HR-al összekapcsolható jelenség patogén támadás során. NO kezelés burgonya gumóban és szója sziklevelekben fitoalexin szintézisét eredményezi (Noritake, T. 1996; Modolo, L.V. 2002).

Mint láttuk a nitrogén oxid a növényi szervezet rendkívül sokrétű szignalizációs molekulája, a növényi metabolizmus, szignalizáció, védekezés és fejlődés kulcs regulátora.

### **2.3.7. NO és a sejtciklus szabályozása**

Az NO jelátviteli út és a sejt osztódását és differenciációját szabályozó folyamatok kapcsolata emlős sejtekben kellőképpen megalapozott. A vaszkuláris rendszerben a nitrogén oxid vazodilatátor funkciója mellett antiproliferatív és antiapoptotikus környezetet biztosít a véredények falának (Sessa, W.C. 2004). Az NO

antiproliferatív hatása a p53 tumor szupresszor gén expressziójának serkentésével (Mizuno,S. 2004) és a sejtciklus inhibítor p21<sup>cip/waf</sup> expressziójának indukálásával vagy degradációjának gátlásával és/vagy a ciklin A és kináz partnerének negatív regulációjával valósul meg (Maejima,Y. 2003; Guo,K. 1998). Ezenkívül exogén NO kezelés többféle sejttenyészetben is a sejtciklus G2 fázisban való feltartóztatásához vezetett (Janssen,Y.M. 1998; Mohr,S. 1998; Shao,C. 2003; Takagi,K. 1994). Pervin és munkatársai ugyancsak exogén NO kezeléssel egy humán mellrák sejtvonalban indukáltak citosztázist, ami a sejtciklus G1 fázisában való blokkolása útján, a ciklin D1 fehérje expressziójának gátlásával valósult meg (Pervin,S. 2001). Mindezekkel összhangban, neuronális sejttenyészetekben a NOS, mint növekedésgátló fehérje funkcionál, a citosztázis kialakulásában vesz részt a sejtdifferenciáció során, valamint gerincesek agyának fejlődésekor, a neuronális prekursor sejtek proliferációjának negatív regulátora (Peunova,N. 2001; Peunova,N. 1996; Peunova,N. 1995). Állati rendszerekben az NO endogén szintjének tehát kifinomult szabályozás alatt kell állnia végig a sejtciklus során. Növényekben azonban egyáltalán nem tisztázott az NO sejtciklusra gyakorolt hatása. Dolgozatunkkal ezt a hiányt próbáljuk pótolni.



### 3. Célkitűzések

Munkánk során alapvetően arra voltunk kíváncsiak hogy a nitrogén oxid, mint egy növekedési és fejlődési regulátor,

- részt vesz-e a növényi sejtek osztódásának szabályozásában és
- van-e szerepe a szomatikus embriogenezis folyamatának elindításában.

Ehhez két kísérleti megközelítést használtunk. A lucerna levélsejtekből izolált protoplasztok tenyészetét, ahol a sejtosztódás reaktivációja és a szomatikus embriogenezis első lépései jól tanulmányozhatók és egy folytonosan osztódó dedifferenciált sejt kultúrát, amely kiválóan alkalmas a sejt ciklus nyomonkövetésére.

## 4. Anyagok, módszerek és a kísérleti rendszer ismertetése

### 4.1. A kísérleti növények és sejtkultúrák fenntartása

*Medicago sativa* L. ssp. *varia*; embriogén A2 genotípusú növényeket steril körülmények között, szilárd MS (Murashige, T. 1962) táptalajban 22°C-on 16:8 órás fotoperiódus alatt tartottuk (Pasternak, T.P. 2000; Pasternak, T.P. 2002).

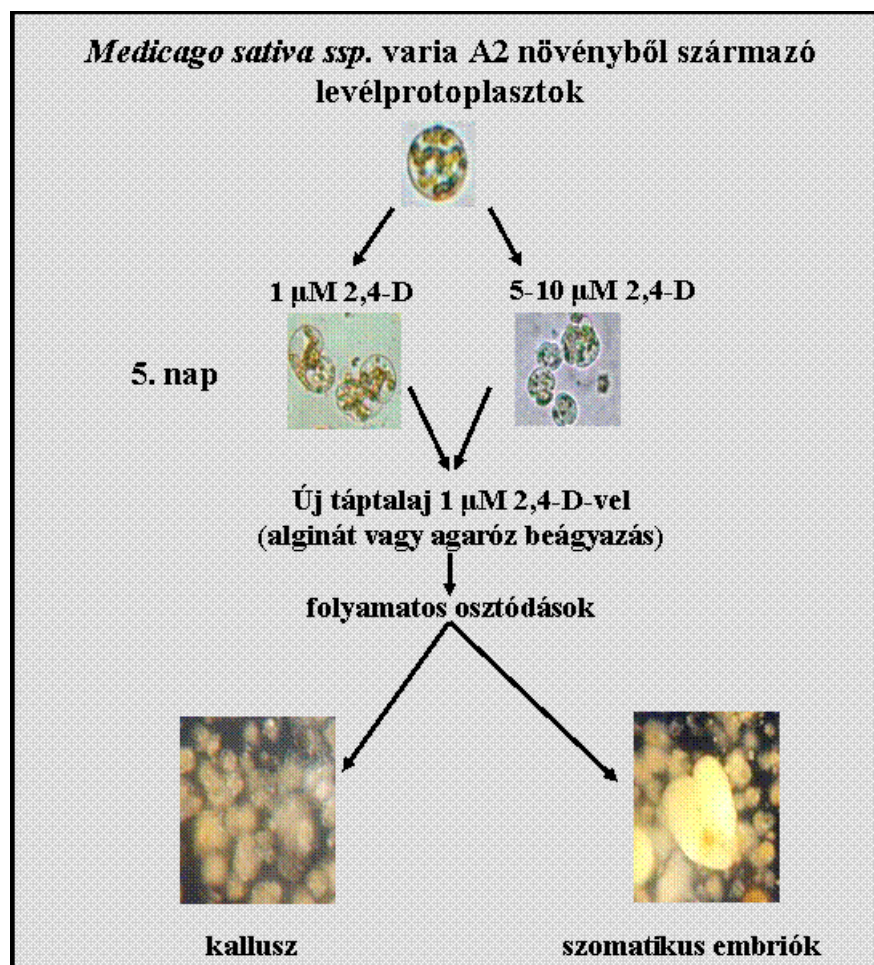
Az ugyanezen genotípusból származó sejtszuszpenziót hetente oltottuk át 0.2 µM 2,4-diklórfenoxiecetsavat (2,4-D) és 1 µM kinetint tartalmazó folyékony MS táptalajba.

### 4.2. Lucerna levélprotoplaszt izolálása és tenyésztése

4-6 hetes, steril körülmények között nevelt lucerna növényekről kb. 1 g levelet gyűjtöttünk, majd azokat K75 oldatban (Kao, K.N. 1980) apró darabokra vágtuk steril borotvapengével. A levéldarabokat K75 oldattal átöblítettük. A protoplaszt izolálást K75 tápoldatban oldott enzimkeverékkel (0.5 % Cellulase Onozuka R10, 0.5 % Macerozyme R10, 0.25 % Rhozyme) 16 óráig 22°C-on sötétben végeztük. A protoplasztokat 60 µm pórusátmérőjű szűrő segítségével megtisztítottuk, majd a levéldarabokat addig mostuk K75 oldattal, míg belőlük protoplasztok kiszabadulását észleltük. A megmosott protoplasztokat 3 percig 300 g-vel centrifugáltuk. A leülepedett protoplasztokat K75 tápoldatban szuszpendáltuk, kétszer ugyanezzel a tápoldattal mostuk és centrifugáltuk. Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd a sejtsűrűséget  $10^5$  protoplaszt/ml-re állítottuk. A protoplasztokat K75 tápoldatban

tenyésztették, mely 2.2  $\mu\text{M}$  zeatint és a kísérlettől függően különböző 2,4-D ill. NO donor, NOS inhibitor és NO fogó koncentrációkat tartalmazott.

Az embriogén genotípusú lucerna levélprotoplaszt kultúra sejtjei, a tenyésztés első négy napján különböző 2,4-D koncentráció jelenlétében tenyésztve, beágyazásukat követően különböző sejtsorsot követnek. Alacsony (1  $\mu\text{M}$ ) 2,4-D jelenlétében a sejtek osztódásuk reaktivációja előtt megnyúlnak, végül differenciálatlan kallusz szövetet alkotnak. Magas (5-10  $\mu\text{M}$ ) 2,4-D jelenlétében viszont a sejt kultúra sejtjei kicsi, sűrű citoplazmával és kis vakuolummal rendelkező sejtekké alakulnak át. Ezek a sejtek asszimmetrikusan osztódnak és embriogén sejtsoportokat, majd szomatikus embriókat képeznek (7. ábra).



7. ábra. Lucerna levélprotoplasztok fejlődése különböző 2,4-D koncentrációk mellett.

Magyarázat a szövegben.

A sejtosztódás reaktivációját 0-5 napos tenyészetekben vizsgáltuk. A szomatikus embriók fejlődésének megfigyeléséhez a sejteket agarózba ágyztuk. A beágyazást a következők szerint végeztük: a lucerna protoplasztkultúrát 3-4 napig 0.4 M glükózzal, 0.1 M mannitollal, 1 ill. 10  $\mu$ M 2,4-D mesterséges auxinnal, 2.2  $\mu$ M zeatin riboziddal és a kezeléstől függően 10  $\mu$ M SNP-vel ill. 1 mM L-NMMA-val kiegészített folyékony sejt kultúrában tenyésztettük. A négy napos sejteket 1.6 % alacsony olvadáspontú agarózt (Seaplaque), 0.4 M glükózt, 1  $\mu$ M 2,4-D-t és 2.2  $\mu$ M zeatint tartalmazó K75 táptalajba ágyztuk. A beágyazott protoplaszt eredetű sejtekre folyékony, 0.4 M glükózt, 0.57  $\mu$ M indol-ecetsavat és 2.2  $\mu$ M zeatint tartalmazó K75 táptalajt szélesztettünk. A sejteken a folyékony táptalajt kéthetente cseréltük, melyben az ozmotikumot folyamatosan csökkentettük, egészen 0.2 M glükóz koncentrációig. A sejttenyészetek morfológiai változását mikroszkópos felvételeken rögzítettük.

#### **4.3. A sejtek életképességének, morfológiájának és osztódásának meghatározása**

A sejtek életképességét Evans-kék festéssel határoztuk meg (Baker, C.J. 1994). A módszer lényege, hogy az ép sejtek számára nem permeábilis festék csak a károsodott plazma membránnal rendelkező, halott sejteket festi meg, így egy adott sejtpopulációban könnyedén meghatározható a halott (kék) sejtek aránya az összsejtszámhoz viszonyítva. A sejtek megnyúlásának mértékét optikai mikroszkóp segítségével 500-szoros nagyításnál állapítottuk meg, kezelésenként negyven random sejt legnagyobb hosszúságának és szélességének arányaként. Az osztódó sejtek arányát optikai mikroszkóp használatával határoztuk meg, kezelésenként 500 sejtben számoltuk meg a citokinézisek számát.

#### **4.4. Az S fázis arányának megállapítása BrdU sejtmagi DNS-be történő beépülésével**

Egy adott sejtpopulációban és egy adott időintervallumban az S fázis arányának megállapításához a protoplaszt eredetű sejteket egy napig, frissen készített, 30  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú timidin analóg bróm-deoxi-uridinnal (BrdU) inkubáltuk sötétben. A replikáció során a sejtek DNS-ébe beépült BrdU jelenlétét immunológiai eljárással detektáltuk. A sejteket 3.7 % formalinnal fixáltuk, háromszor mostuk foszfát pufferes sóoldattal (PBS: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  1 liter desztillált vízben oldva), majd egy óráig 28°C-on inkubáltuk a DNS denaturálásához szükséges nukleázt is tartalmazó BrdU specifikus monoklonális egér ellenanyag oldattal (Amersham). Újabb PBS mosás után a sejteket további egy óráig, 28°C-on sötétben FITC (fluoreszcein izotiocianát) jelölt egér IgG elleni másodlagos ellenanyaggal kezeltük. A sejteket végül megfestettük a kettősszálú DNS-sel komplexet képző 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  végkoncentrációjú fluoreszcens festék oldatával. A mintákról Nikon Eclipse TE300 típusú invert fluoreszcens mikroszkóppal és SPOT-RT II. kamerával felvételeket készítettünk. A FITC fluoreszcens festéket 490 nm-en, a DAPI festéket 365 nm-en gerjesztettük egy 100 wattos HBO fényforrás segítségével. Kezelésenként minimum 500 sejtben összesítettük a FITC jelölt sejtmagok (S fázison átesett) számát.

#### **4.5. Áramlásos citometria**

A protoplasztokból vagy a protoplaszt eredetű sejtekből Galbraith és munkatársai útmutatásai szerint óvatos pipettázással izoláltunk sejtmagot (Galbraith, D.W. 1983). A szuszpenziósejteket a magizolálás előtt rövid sejtfalemészítő

kezelésnek vetettük alá (3% celluláz YC, 1% pektináz, 1% macerozim keverékének feloldása literenként 94 g mannitolt és 1g CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó oldatban). A sejtmagokat 5 µg ml<sup>-1</sup> végkoncentrációjú propidium joddal (PI) megfestettük és belőlük 5-10 x 10<sup>3</sup> darab sejtmagban meghatároztuk a relatív DNS tartalmat FACSCalibur áramlásos citométer segítségével. A sejtciklus analízisét ModFit<sup>®</sup> szoftverrel végeztük.

#### 4.6. Lucerna szuszpenzió sejtkultúra szinkronizálása kettős foszfát éheztetéssel

A szinkronizációt Kapros és munkatársai útmutatásai alapján végeztük (Kapros, T. 1992). A szuszpenzió sejtkultúrát 2 nappal átoltása után háromszor mostuk foszfát mentes táptalajjal, majd három napig foszfát mentes táptalajban tenyésztettük. Három nap elteltével egy napra pótoltuk a táptalajból a foszfátot 0.2 mM végkoncentrációjú KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hozzáadásával. Egy nap után a sejteket mosás és centrifugálás után négy napra ismét foszfát mentes táptalajra oltottuk át. A sejtek így módon blokkolt sejtciklusát 0.675 mM végkoncentrációjú KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hozzáadásával indítottuk el.

#### 4.7. Fehérje extrakció

A folyékony nitrogénben fagyasztott és felhasználásig -80°C-on tárolt növényi mintákat jégen tártuk fel kvarchomok és extrakciós puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM NaF, 60 mM β-glicero-foszfát) jelenlétében. Az extrakciós puffer 1 mM PMSF-t (fenilmetilszulfonil fluorid), 2 mM DTT-t (ditiotreitolt) és 10 µl/ml proteináz inhibitor keveréket (Sigma) tartalmazott. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagenssel, 595 nm-en spektrofotométerrel határoztuk

meg. Az immunoblot (Western blot) kísérletekhez mintánként 50 µg fehérjét használtunk fel.

#### 4.8. Immunoblot

A mintákban található fehérjéket móltömegük alapján SDS PAGE technikával elválasztottuk. Az elektroforézis végeztével a gélből a fehérjéket PVDF membránra transzferáltuk (blottotuk). A filtereket tejporos oldatban két órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% tejport és 0.05% Tween 20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-CL, pH8.0, 150 mM NaCl) pufferben, majd az adott elsődleges ellenanyaggal  $1 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  IgG koncentrációban egy óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az alkalmazott elsődleges ellenanyagok a lucerna Medsa;CDKA;1,2 és Medsa;CDKB;2,1 (Magyar,Z. 1997) valamint a Medsa;CYCD5;1 (Mészáros,T. 2000) fehérjék C terminális peptidjét felismerő ellenanyagok, a lucerna ferritin (Deák,M. 1999) fehérje esetén pedig a teljes fehérje ellen termeltetett ellenanyagok voltak, melyek mindegyike előzőleg affinitás tisztításon esett keresztül. Az elsődleges ellenanyaggal történt inkubáció után a membránt mostuk 0,2% Tweent tartalmazó TBS-vel. Mosás után a membránt peroxidáz enzimmel kapcsolt másodlagos ellenanyag tejporos oldatában inkubáltuk a gyártó (Sigma) által javasolt koncentrációban. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátjával („Lumi-Light Western Blotting Substrate”, Roche) kezeltük a membránt, a lumineszcenciát pedig röntgenfilmmel detektáltuk.

#### 4.9. A CDK aktivitás meghatározása

A CDK aktivitás meghatározását Magyar és munkatársai leírása alapján végeztük (Magyar,Z. 1997; Magyar,Z. 1993). A sejteket folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejtek fehérjetartalmának mechanikai feltárását homogenizációs puffer (25 mM Tris-HCL, pH7.5, 75 mM NaCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM EGTA, 15 mM p-nitrofenilfoszfát, 60 mM  $\beta$ -glicero-foszfát, 1 mM DTT, 0.1% Nonident P-40, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5 mM NaF, 1 mM fenilmetilszulfonil fluorid, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, aprotinin és antipain, valamint 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepsztatin és kimosztatin) és kvarchomok jelenlétében végeztük. Centrifugálást követően a felülúszót új, 2 – 4  $\mu\text{g}$  CDK ellenanyagot tartalmazó Eppendorf csőbe pipettáztuk és  $4^{\circ}\text{C}$ -on egy óráig állni hagytuk. A következő lépésben a csövekhez 15  $\mu\text{l}$  50% (v/v) Sepharose-A (Amersham Bioscience) gyöngyöket adtunk (melyeket előzőleg foszfát puffer sóoldattal egyensúlyoztattuk), majd az elegyet enyhe rázás mellett egy óráig  $4^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A gyöngyöket háromszor mostuk RIPA pufferrel (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 0.2% Nonident P-40, 1 mM fenilmetilszulfonilfluorid és 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin és leupeptin) és egyszer kináz pufferrel (50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 5 mM EGTA). A kináz reakciót 0.5 mg/ml H1 hisztonnal és 2.5  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP-vel kiegészített kináz pufferrel indítottuk el és 30 perc elteltével SDS minta puffer hozzáadásával és 3 perc forralással állítottuk le. A mintákat a továbbiakban 12% SDS PAGE technikával analizáltuk, a kapott jelet pedig röntgenfilmen detektáltuk.



#### 4.10. Génexpressziós vizsgálatok

Egységnyi mennyiségű ( $200-250 \times 10^5$ ) protoplaszt eredetű sejtek hírvivő RNS (mRNS, messenger RNS) tartalmát „Dynabeads mRNA Direct Kit” alkalmazásával izoláltuk (Dyna). A gyöngyökhöz kapcsolt mRNS populációt RNáz mentes DNázzal (Sigma) kezeltük, hogy elkerüljük a genomiális DNS szennyeződést. Az izolált mRNS tisztaságát PCR (polimeráz láncreakció) reakcióval aktin primerek segítségével ellenőriztük, úgy hogy az mRNS mennyisége hétszerese volt a cDNS szintézishez használt mennyiségnek. Az egyszállú cDNS (az mRNS-ről átírt DNS kópia) szintézisét RevertAid M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) 40 U RiboLock ribonukleáz inhibitor (Fermentas) jelenlétében végeztük. A vizsgálni kívánt gének relatív expresszióját valós idejű PCR-al, az Applied Biosystems cég ABI Prism 7000 szekvencia detektáló rendszerével végeztük, ugyanezen cég „SYBR-green PCR Master Mix” reakció elegyének felhasználásával a cég által javasolt módon. Az *MsSERK1* primer szekvenciák megegyeztek a Nolan által közöltekkel (Nolan, K.E. 2003). A következő lucerna génekre a Primer Express software-rel terveztünk primereket:

Aux28 forward 5'-GGAAAATGCAAGAACAGGAGCTA-3',

reverse 5'-GGAGCAGGTGGCGAACAAG-3',

Medsa;CYCA1;2 forward 5'TTTCTTGCACGATGGACATTAGA-3',

reverse 5'-GAGGCATAGTGTTCAAGAGTTGGA-3';

Medsa;CycD3;1 forward 5'-TGTTTAAGAAGACCAAGAATCAAGGA-3',

reverse 5'-TGGCAAGAATTCCGACAATG-3'.

Endogén kontrollként az aktin B (TC86577) gént használtuk (primerek: forward 5'-TCCTAGGGCTGTGTTTCCAAGT-3', reverse 5'-CATACCGGTGTCATGGTTGG-3'). A primerek specifikitását a PCR termékek végpont disszociációs analízisével és

klónozással állapítottuk meg. A valós idejű PCR reakciókat három ismétlésben végeztük, majd a kapott eredményeket az ún. komparatív küszöb ciklus (CT) módszerrel értékeltük, a gyártó útmutatásai szerint. A bemutatott adatok három független kísérletből származnak.

##### **4.11. Az NO fluoreszcens kimutatása DAF-2 DA-val**

A bevezetésben már említett fluoreszcens megközelítést, az NO *in vivo* detektálására alkalmas DAF-2 DA festék használatát próbáltuk adaptálni protoplaszt rendszerünkre. A sejteket 30 percig inkubáltuk táptalajukban 10  $\mu$ M végkoncentrációjú DAF-2 DA festékkel, majd a mikroszkópos vizsgálat előtt a felesleges festék eltávolításának érdekében W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 5 mM glükóz) oldatos mosást alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyelést sötétben, SPOT RT II Color CCD kamerával felszerelt Nikon Eclipse TE 300 típusú epifluoreszcens invert mikroszkóppal végeztük. A festéket 475 nm-en gerjesztettük, az emissziót 535 nm-en detektáltuk. Annak érdekében, hogy elkerüljük a fluoreszcencia fotoaktivációját a sejteket csak a felvétel elkészítésének idejére világítottuk meg. Negatív kontrollként 4-aminofluoreszcein diacetátot (4-AF DA), a DAF-2 DA nem NO specifikus származékát használtuk.

## 5. Kísérleti eredmények

### 5.1. A kísérleti rendszerek

A nitrogén oxid biológiai hatásainak vizsgálata teljes növények esetében bonyolult feladat, különösen, ha olyan, az egyedi sejtek szintjén zajló eseményeket kívánunk vizsgálni, mint a sejtosztódás illetve differenciáció. Az *in vitro* növényi sejt kultúrák ebből a szempontból ideális kísérleti objektumok, hiszen amellet, hogy így nagyszámú egyedi sejt egyidejű kezelésére és megfigyelésére nyílik lehetőség, az NO sejteken belüli szintje jól bevált farmakológiai módszerekkel (NO donoroknak, csapdáknak és NO szintézis inhibitoroknak a tápközeghez adásával, lásd az Irodalmi áttekintést) egyszerűen megváltoztatható.

Kísérleteink során két fő rendszert használtunk. Differenciált levél sejtekből előállított protoplasztok tenyésztését és egy folytonosan osztódó dedifferenciálódott sejtekből álló sejt kultúrát. Az első esetben a nitrogén oxidnak a sejtosztódás reaktivációjára és a sejtek osztódására/differenciációjára, míg az utóbbi esetben a sejt ciklus gépezetére gyakorolt hatását tudtuk megvizsgálni.

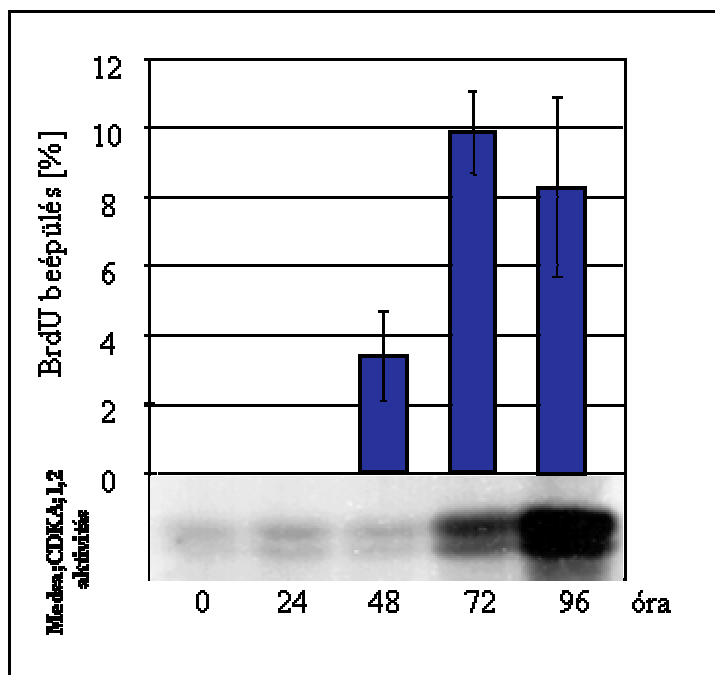
Az alábbiakban, a kutatócsoport korábbi eredményeire alapozva, röviden ismertetem ezt a két kísérleti rendszert.

#### 5.1.2. A lucerna levélprotoplaszt rendszer fő jellemzői

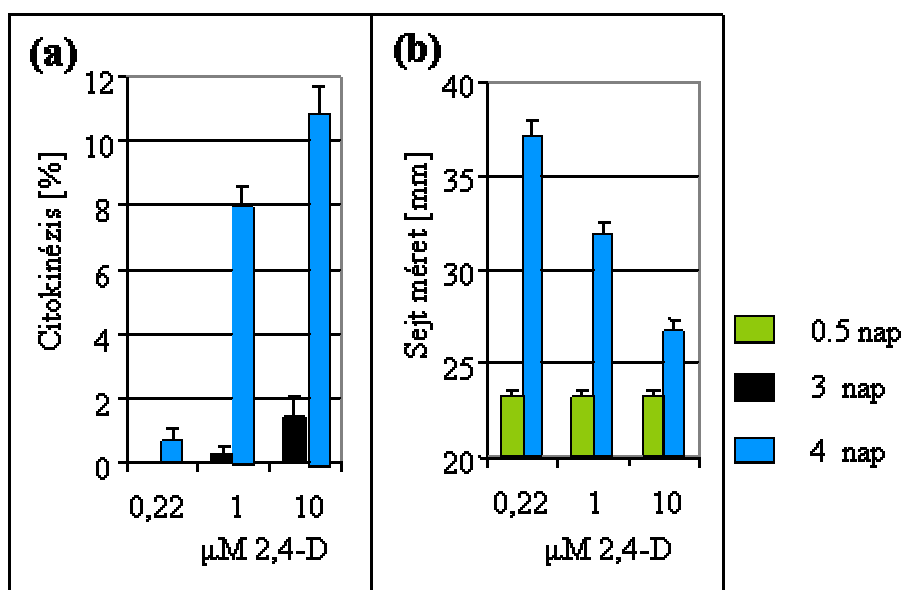
Taras Pasternak és Miskolczi Pál kísérletei (MTA-SZBK) (8. és 9. ábra) alapján elmondható, hogy az általunk alkalmazott, *Medicago sativa ssp. varia* A2 *in vitro* növények leveleiből származó, protoplaszt tenyésztési rendszer kísérleteink szempontjából két lényeges tulajdonsággal bír. Egyrészt az egyedi sejtek homogén

populációt alkotnak, így a sejteknek a sejtciklusba való belépése szinkronizáltan zajlik (8. ábra). Az S fázis-specifikus markerként alkalmazott BrdU jelölés és a Medsa;CDKA;1,2 kináz G1/S fázis specifikus aktivitása is jelzi, hogy a sejtek megfelelő körülmények között egy adott időintervallumban (ez általában a tenyésztés 2-3. napja) lépnek be a sejtciklusba, és a sejtek többsége a tenyésztés harmadik napjára (72 óra) eléri a sejtciklus S fázisát. Másrészt, a levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódásának gyakorisága és a sejtek mérete függ a táptalaj auxin (2,4-D) koncentrációjától (9. a,b ábra). Nagyon alacsony, 0,22  $\mu\text{M}$ , 2,4-D koncentráció esetén a protoplaszt eredetű sejtek megnyúlnak és még a kezelés 4. napján is alig osztódnak. Alacsony, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D, koncentráció esetén a sejtek szintén megnyúlnak, de aktívan osztódnak, míg magas, 10  $\mu\text{M}$ , 2,4-D koncentráció alkalmazása esetén a tenyésztés 4. napján asszimmetrikusan osztódó, sűrű citoplazmával és kis vakuóllummal rendelkező izodiametrikus sejtek figyelhetők meg a tenyésztő oldatban.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy a sejtosztódás aktiválódását kiváltó legkorábbi események (G0/G1 átmenet) megfigyelésére és a sejtciklus kezdeti szakaszainak (G1 illetve S fázisok) vizsgálatára a lucerna levélprotoplasztok rendszere kiválóan alkalmas.



8. ábra. A levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklusba való lépésének nyomonkövetése BrdU sejtmagba történő beépülése és a Medsa;CDKA;1,2 kináz aktivitásának detektálása segítségével.



9. ábra. Lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódásának (a) és megnyúlásuk mértékének (b) 2,4-D (mesterséges auxin) koncentráció függése, a tenyésztés különböző időpontjaiban vizsgálva.

### **5.1.2. A lucerna sejtszuszpenziós kultúra fő jellemzői**

Laboratóriumunkban több mint két évtizede került sor az A2-vel jelölt *M. sativa* ssp. *varia* sejt kultúra létrehozására gyökér eredetű kalluszsövetből. A kultúra néhány sejtből álló kolóniák szuszpenziója. A sejtek osztódási ciklusának hossza kb. 24-30 óra hetente történő áttöltés (1:10 hígítás friss tápoldattal) esetén.

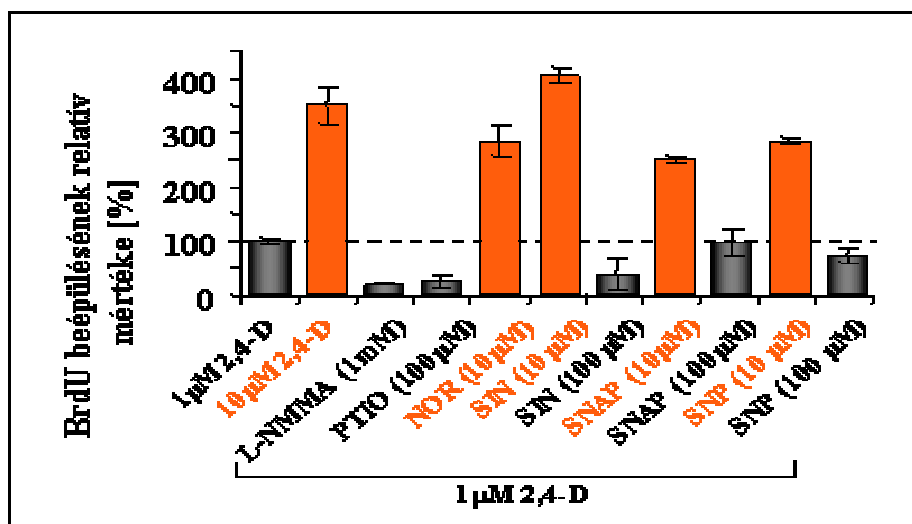
A sejtek jól szinkronizálhatóak a G1/S fázis átmenetben hidroxürea illetve afidikolin kezeléssel (Magyar,Z. 1993, 1997; Mészáros,T. 2000). Az S-fázisban levő sejtek gyakorisága az alkalmazott szinkronizáló ágens eltávolítását követően elérheti a 80%-ot. Bár az M-fázisban megfigyelhető szinkronitás ritkán haladja meg a 20%-ot, a kultúra sikeresen volt alkalmazható sejtciklus függő génexpresszió illetve kináz aktivitás vizsgálatok elvégzésére (Magyar,Z. 1993, 1997), és így a növényi sejtciklus kutatás egyik modellrendszerévé vált (Mészáros,T. 2000).

## **5.2. Az NO hatása lucerna protoplaszt eredetű sejtek sejtosztódására és morfológiájára**

### **5.2.1. Az NO hatása a tenyésztés harmadik napján a DNS replikációra képes levélprotoplaszt eredetű sejtek arányára**

Annak érdekében, hogy megtudjuk hatással van-e a nitrogén oxid a protoplaszt eredetű sejtek osztódására, különböző NO donorok (NOR-3, SIN-1, SNAP, SNP, furoxan), NO fogó (PTIO) és az NOS gátlószer (L-NMMA) jelenlétében tenyésztett sejtekben határoztuk meg a bróm-deoxi-uridin sejtmagi DNS-be való beépülésének mértékét. Az alkalmazott koncentrációk azonosak voltak az állati rendszerekben általánosan elfogadott koncentrációkkal. A 10. ábrán látható, hogy néhány NO donor

(NOR-3, SIN-1, SNAP és SNP) bizonyos koncentrációban serkentette, míg az NO fogó és a NOS inhibitor gátolta, a BrdU DNS-be való beépülésének mértékét a bróm-deoxiuridin kezelés 24 órás időtartama alatt. Az NO donorok hatása koncentráció függő volt: amíg 10  $\mu\text{M}$  serkentette, 100  $\mu\text{M}$  már gátolta az S fázis gyakoriságának a BrdU beépülés által jelzett emelkedését. Az NO donor NOR-3 100  $\mu\text{M}$  és a furoxán 10  $\mu\text{M}$  és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban való alkalmazása toxikus hatással volt a protoplaszt eredetű sejtekre mivel a szerek hatására a sejtek elhalását figyelhettük meg.

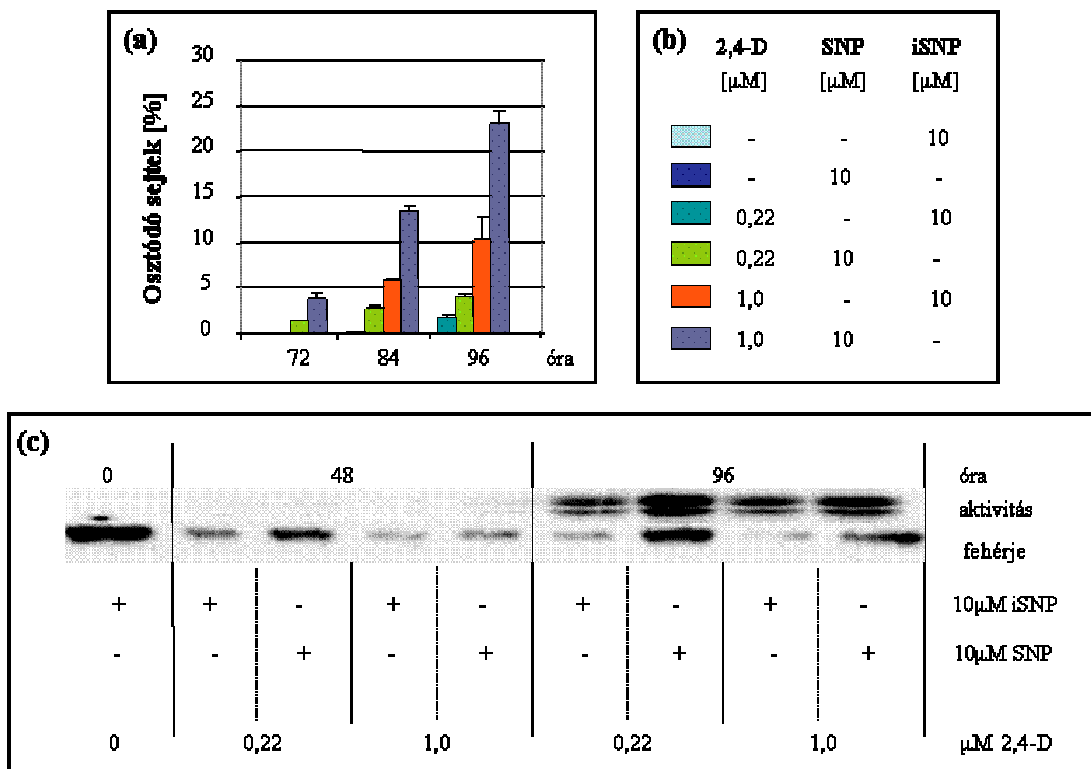


10. ábra. NO donorok (NOR-3, SIN-1, SNAP, SNP), az NO fogó (PTIO) és a NOS inhibitor (L-NMMA) hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtmagi DNS-ébe történő BrdU beépülés (S-fázis) gyakoriságára.

A protoplasztokat izolálásukat követően 1  $\mu\text{M}$  2,4-D és az adott kémiai ágens jelenlétében tenyésztettük. Pozitív kontrollként a 10  $\mu\text{M}$  2,4-D jelenlétében tenyésztett sejteket használtuk. A BrdU-t 24 órás pulzusban 24 órával a sejtek S fázisba való lépésének időpontja előtt alkalmaztuk. Az S fázis várható időpontját előzőleg áramlásos citometriás méréssel határoztuk meg. A feltüntetett értékek relatívok, 100 %-nak az 1  $\mu\text{M}$  2,4-D jelenlétében tenyésztett sejtpopuláció S fázison átesett sejtjeinek az összes kezelt sejthez viszonyított arányát tekintettük. A piros szín az S-fázis gyakoriság emelkedést, a sötétszürke a csökkenést jelzi a kontrolhoz képest. Az oszlopok tetején a szórást tüntettük fel, mely három független kísérlet eredményéből származik.

### 5.2.2. Az NO donor SNP auxin koncentráció függő módon segíti elő a sejtosztódást lucerna levélprotoplaszt kultúrában

Ahogy a 10. ábrán láthattuk, a nitrogén oxid donorok hatása a protoplaszt eredetű sejtek S fázisának mértékére nagyon hasonló a magas (10  $\mu\text{M}$ ) 2,4-D koncentráció hatásához. Azon célból, hogy pontosabb képet kapjunk az NO donorok és a 2,4-D protoplaszt eredetű sejtekre kifejtett hatásáról, 10  $\mu\text{M}$  SNP hiányában és jelenlétében, különböző 2,4-D koncentráción tenyésztett sejtek különféle paramétereit vizsgáltuk meg. Negatív kontrollként inaktivált SNP-t (iSNP), egy napig direkt fénynek kitett SNP oldatot alkalmaztunk ugyanazon koncentrációban, mint aktív változatát, hogy biztosak legyünk abban, hogy a kapott hatást az NO (pontosabban, az SNP esetében  $\text{NO}^+$ ), és nem a szer egyéb bomlásterméke váltotta ki. Az iSNP-nek ebben a koncentrációban semmilyen szignifikáns hatása nem volt a protoplaszt eredetű sejtek fejlődésére, így a továbbiakban ezt a kezelést tüntetjük fel ábráinkon kontrollként.





**11. ábra. Az NO donor SNP hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódására.**

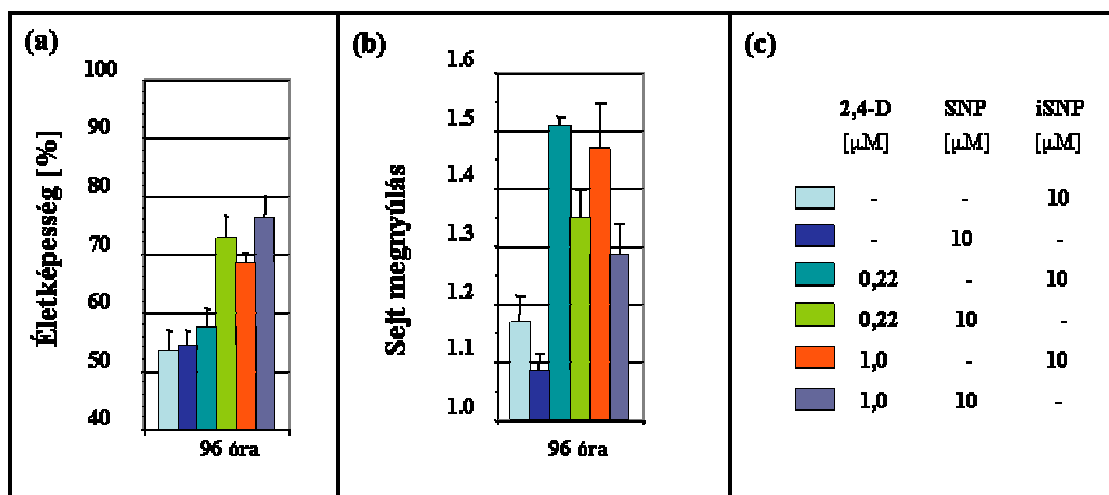
(a) Az osztódó sejtek arányát mikroszkóp használatának segítségével határoztuk meg 500 sejtet megvizsgálva.

(b) Az oszlopdiagrammhoz tartozó magyarázat.

(c) A lucerna p34<sup>cdc2</sup> ciklin dependens kináz (Medsa;CDKA;1,2) fehérje mennyiségének és a H1 hisztont foszforiláló aktivitásának meghatározása, különböző 2,4-D koncentrációk (0.22 és 1 µM) és SNP illetve iSNP alkalmazásakor, a tenyésztés két időpontjában (48 és 96 óra) .

iSNP – fényen inaktivált (lebomlott) SNP

Auxin hiányában, 10 µM SNP nem befolyásolta a protoplaszt eredetű sejtek osztódását (lásd 11. ábra). Ellenben 0.22 és 1 µM 2,4-D jelenlétében 10 µM SNP szignifikánsan emelte a protoplaszt tenyészetben található életképes és osztódó sejtek arányát (11.a és 12.a ábra). Ezt a megfigyelést támasztja alá a Medsa;CDKA;1,2 kináz aktivitásának növekedése is a 0.22 vagy 1 µM 2,4-D és 10 µM SNP jelenlétében nevelt protoplaszt eredetű sejtekben (11.c ábra).

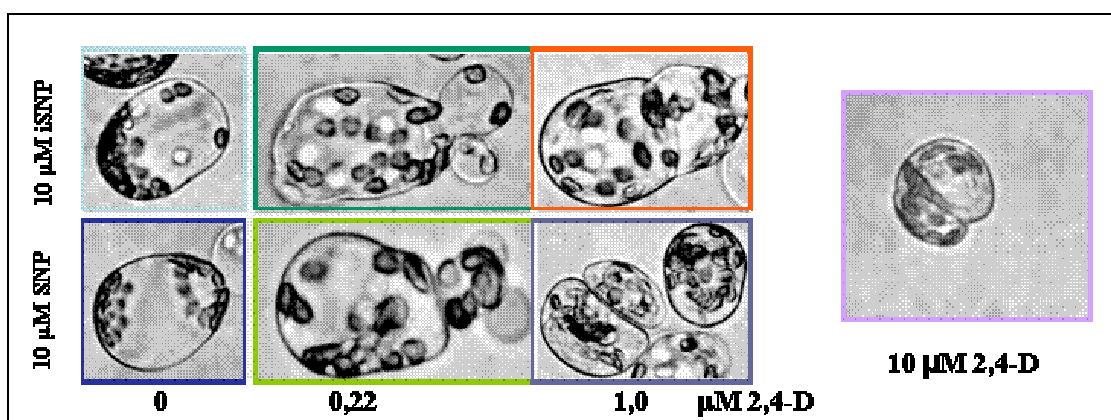
**12. ábra. Az NO donor SNP hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek életképességére és morfológiájára.**

(a) Négy napos sejtek életképességének meghatározása Evans-kék festékkel és megnyúlásuk mértékének ábrázolása a sejtek legnagyobb szélességének és hosszúságának aránya megállapításával (b).

(c) Az oszlopdiagrammokhoz tartozó magyarázat.

Három független kísérlet eredményeinek átlagát és a szórásokat ábrázoltuk a diagrammokon.

Az aktív SNP az alkalmazott koncentrációban ( $10\ \mu\text{M}$ ) hatással volt a sejtek morfológiájára is. Az  $1\ \mu\text{M}$  2,4-D jelenlétében tenyésztett sejtek SNP kezelésének hatására a sejtek megnyúlásos növekedése csökkent (12.b ábra) és az elongált sejtek helyett szférikus, sűrű citoplazmával rendelkező sejtek (13. ábra) jelentek meg a protoplaszt eredetű sejtenyészetben, olyanok, melyek a magas,  $10\ \mu\text{M}$  2,4-D kezelés hatására képződnek.



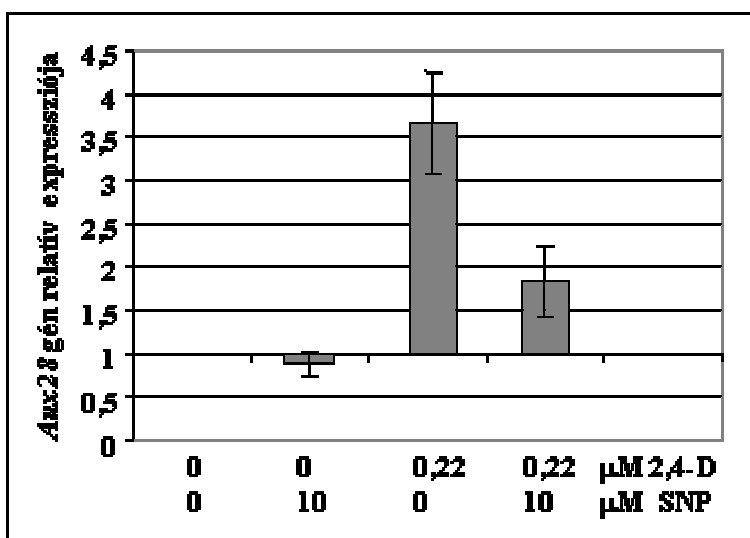
13. ábra. Az NO donor SNP hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek fejlődésére.

Négy napos lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek áteső fényben készült mikroszkópos felvételei, különböző 2,4-D koncentráció (0, 0,22 és  $1\ \mu\text{M}$ ) valamint  $10\ \mu\text{M}$  SNP vagy  $10\ \mu\text{M}$  iSNP kezeléseken (a vonal  $3\ \mu\text{m}$  hosszúságot reprezentál).

### 5.2.3. Az NO és a fitohormon auxin kapcsolata

A protoplaszt eredetű sejtek L-NMMA és SNP kezelésre adott exogén auxin koncentrációtól függő reakciója és a megfigyelés, miszerint auxin hiányában az SNP nem képes elősegíteni a protoplaszt eredetű sejtek osztódását, arra enged következtetni,

hogy az NO megváltoztatja a sejtek auxin érzékenységet vagy/és részt vesz az auxin indukált folyamatokban. Ezen feltételezésünk igazolására az alábbi kísérletet végeztük el: lucerna levélprotoplaszt eredetű sejteket 2,4-D szintetikus auxin és az NO donor SNP jelenlétében vagy hiányában tenyésztettünk és a kultúrákból izolált RNS mintákban meghatároztuk egy ismert auxin-indukált gén (*MsAux28*) relatív expressziójának mértékét (14. ábra). A kísérlet eredményéből egyértelműen kiderül, hogy az alkalmazott koncentrációban (amelyben az SNP egyébként sejtosztódást serkentő hatást mutatott) az NO donor jelenléte csökkentette az *Aux28* gén (melynek terméke az auxin válaszban résztvevő gének kifejeződését gátolja) expresszióját.

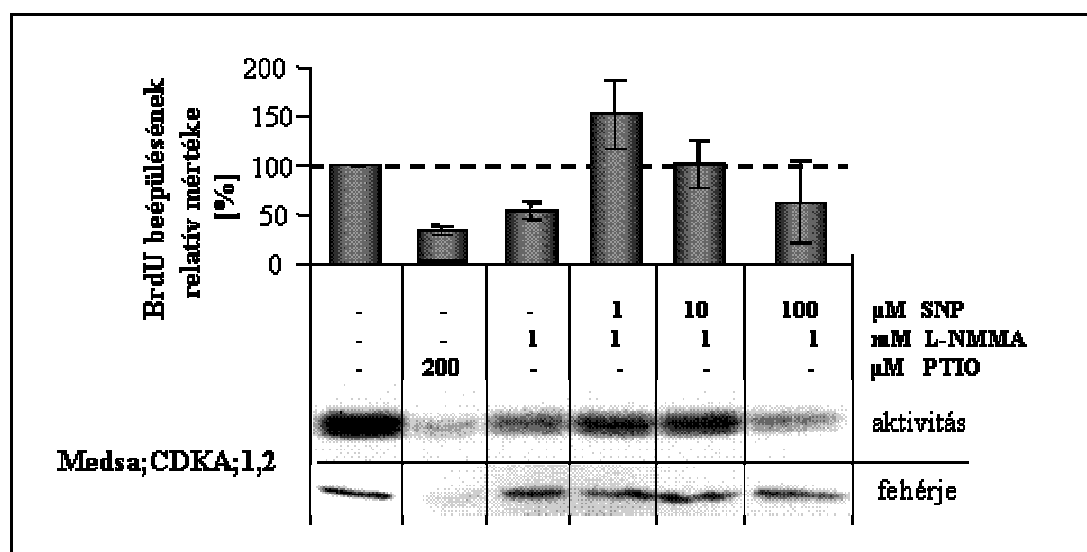


14. ábra. Az auxin regulált *Aux28* gén relatív expressziója valós idejű kvantitatív PCR-al detektálva, lucerna levélprotoplaszt eredetű sejt kultúrában.

A sejteket 2,4-D (0, 0,22 μM) és/vagy SNP (10 μM) jelenlétében tenyésztettük az izolálás kezdetétől. Az értékek normalizálása aktinra történt, a kísérleteket három ismétlésben végeztük el és az ezekből származó szórásokat ábrázoltuk.

#### 5.2.4. A NOS gátló L-NMMA gátolja a sejtosztódás aktivációját, de annak progresszióját nem

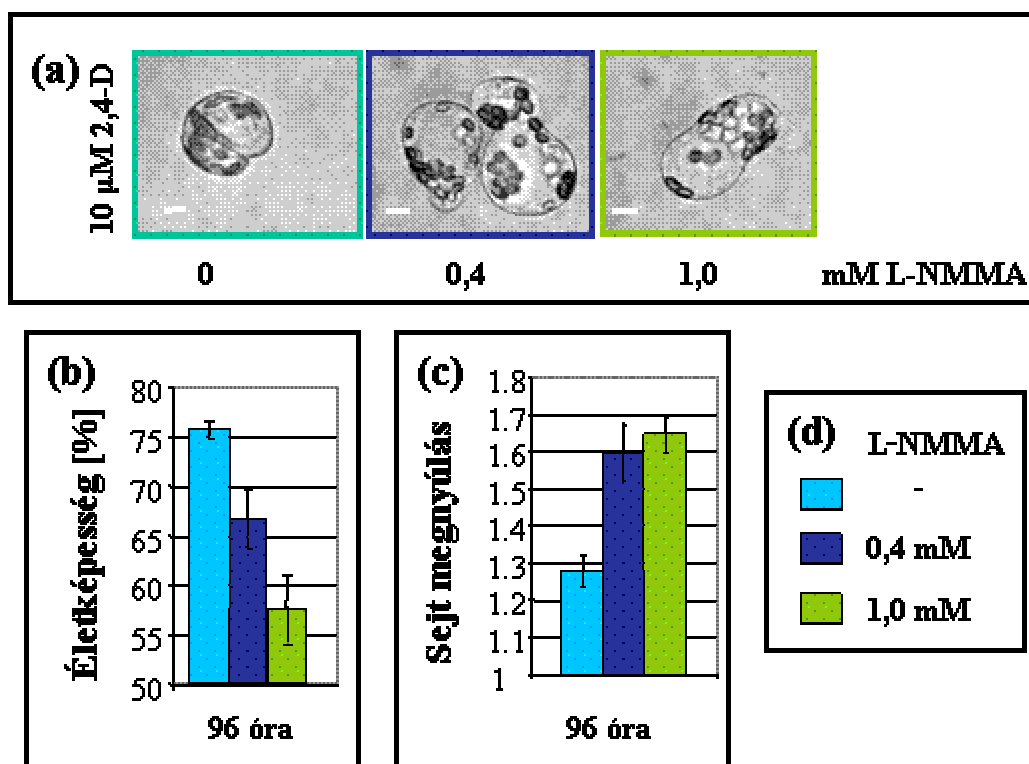
Annak érdekében, hogy tovább szélessük ismereteinket a nitrogén oxid protoplaszt eredetű sejtek osztódásában való részvételéről, frissen izolált és tenyésztett sejteket  $1\ \mu\text{M}$  2,4-D jelenlétében az NO fogó PTIO-val és a NOS gátló állati és növényi rendszerekben is használatos inhibitorával, L-NMMA-val kezeltük (15. ábra). A BrdU beépülésének mértéke, a kináz mennyisége és ezzel párhuzamosan aktivitása is szignifikánsan csökkent  $200\ \mu\text{M}$  PTIO és  $1\ \text{mM}$  L-NMMA hatására is. Az L-NMMA gátlás  $1\text{--}10\ \mu\text{M}$  SNP kezeléssel megfordítható (15. ábra), tehát az S fázison átesett sejtek számának L-NMMA általi csökkentése éppen úgy, mint a kináz aktivitásának csökkenése, valóban NO függő.



15. ábra. Az L-NMMA sejtosztódást gátló hatása SNP kezeléssel kivédhető.

BrdU beépülés mértéke és a Medsa;CDKA;1,2 fehérje mennyiségének és aktivitásának meghatározása az NO fogó  $200\ \mu\text{M}$  PTIO-val vagy NOS gátló  $1\ \text{mM}$  L-NMMA-val és az NO donor SNP-vel ( $1$ ,  $10$  és  $100\ \mu\text{M}$ ) külön és inhibitorral együtt kezelt három napos, protoplaszt eredetű sejtekben. A Medsa;CDKA;1,2 fehérje mennyiségének és aktivitásának változása  $1\ \text{mM}$  L-NMMA hatására a protoplaszt tenyészet első 4 napja alatt.

Megfigyeltük továbbá, hogy az L-NMMA kezelés koncentráció függő módon a nem kezelt kontroll sejtekhez viszonyítva 25-30 %-al csökkentette a sejtek életképességét és ezzel párhuzamosan serkentette a sejtek megnyúlásos növekedését és megváltoztatta morfológiájukat (16. ábra).

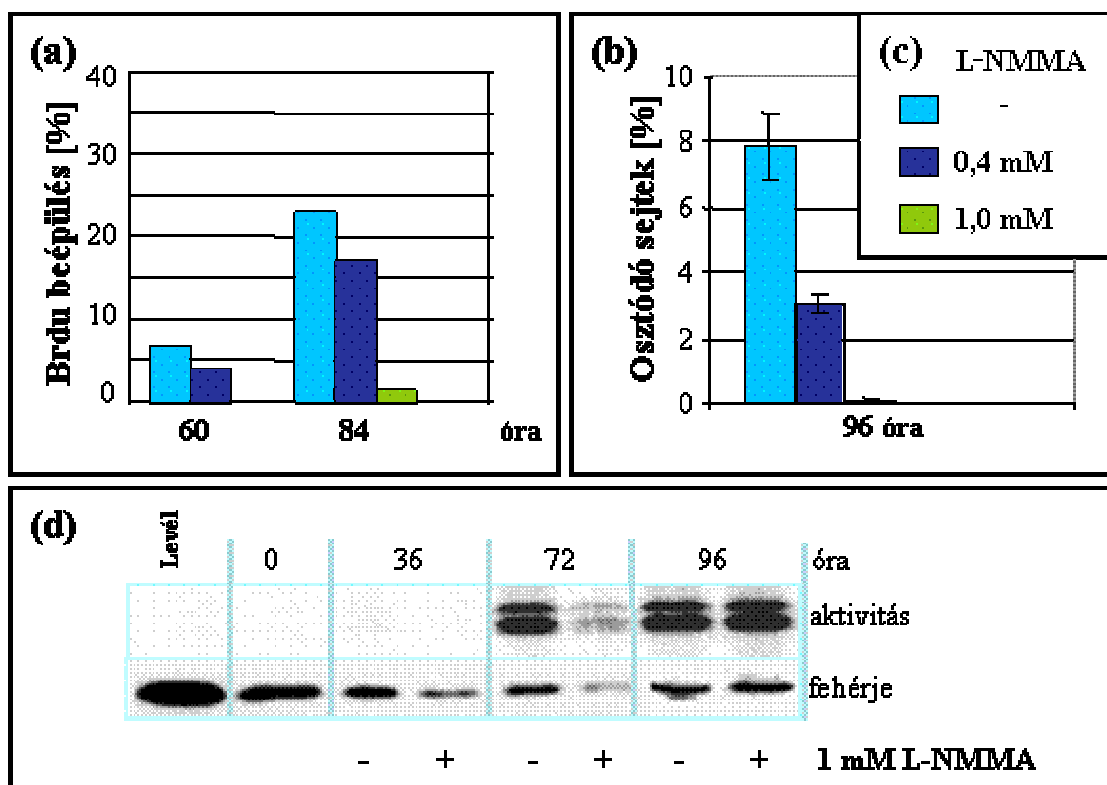


16. ábra. A NOS gátlószer L-NMMA hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek életképességére és morfológiájára.

- (a) 10  $\mu$ M 2,4-D és 0,4 ill. 1 mM L-NMMA jelenlétében vagy anélkül tenyésztett négy napos protoplaszt eredetű sejtek áteső fényben készült mikroszkópos felvétele (a vonal 6  $\mu$ m-es hosszúságot reprezentál).
- (b) 0,4 ill. 1 mM L-NMMA hatása a sejtek életképességére a tenyésztés negyedik napján.
- (c) A sejtek megnyúlásának mértéke (szélesség – hosszúság aránypárral kifejezve) 0,4 ill. 1 mM L-NMMA hatására a tenyésztés negyedik napján.
- (d) Az oszlopdigrammokhoz tartozó magyarázat.

Azt is észrevettük, hogy az L-NMMA koncentráció függő módon csökkentette a tenyésztetben az S fázison átesett, valamint az osztódó sejtek arányát is (17.a,b ábra). A

17.a,b ábrán szemléltetett eredményekből az is kitűnik, hogy az L-NMMA gátló hatása a protoplaszt eredetű sejtek osztódására 1 mM koncentrációban igen nagy mértékű. Ezzel összhangban, 1 mM L-NMMA csökkentette a CDKA kináz fehérje mennyiségét és aktivitását is (17.d ábra).



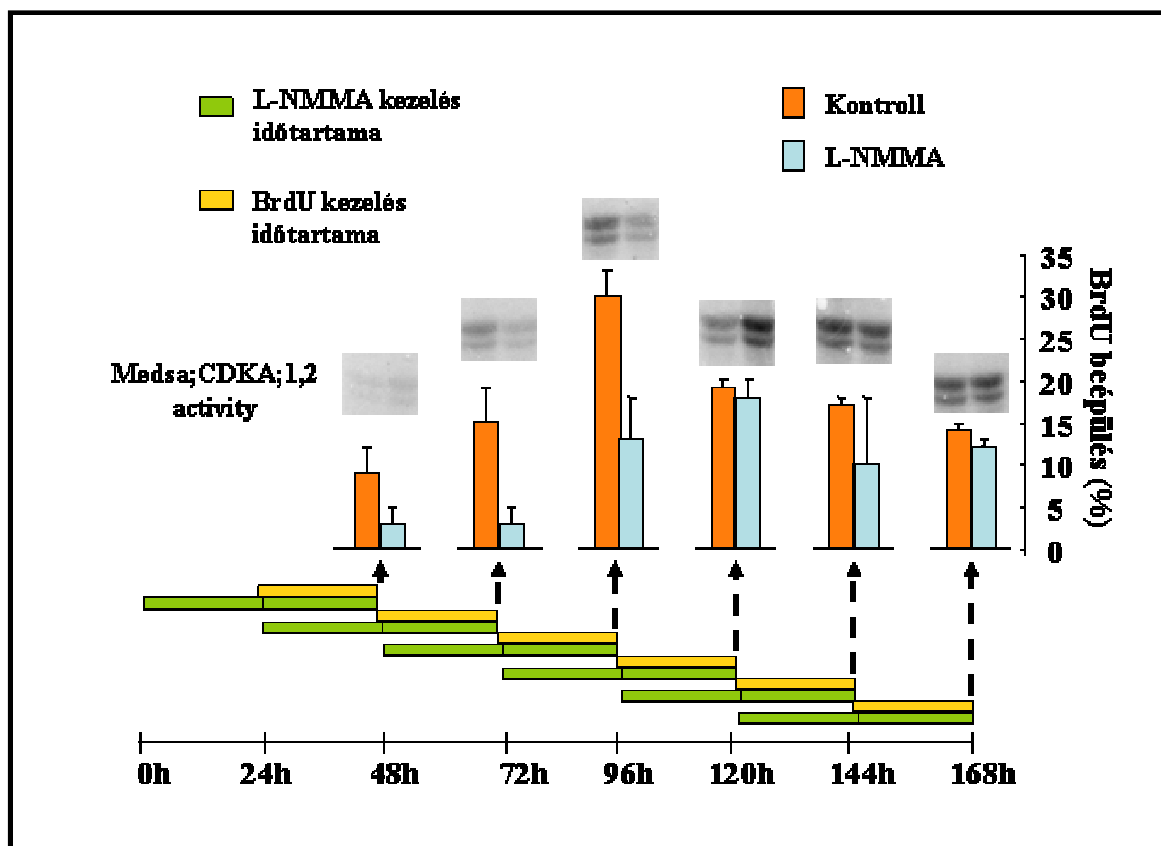
**17. ábra. A NOS gátlószer L-NMMA hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódására.**

- (a) 0,4 és 1 mM L-NMMA hatása a tenyészetben S fázison átesett sejtek arányára.
- (b) Az osztódó sejtek arányának változása 0,4 és 1 mM L-NMMA hatására.
- (c) Az oszlopdiagrammokhoz tartozó magyarázat.
- (d) A Medsa;CDKA;1,2 fehérje mennyiségének és aktivitásának változása 1 mM L-NMMA hatására a protoplaszt tenyészet különböző időpontjaiban..

Feltűnő, hogy az L-NMMA Medsa;CDKA;1,2 fehérje mennyiségére és aktivitására kifejtett gátló hatása a tenyésztés negyedik napján (96h) megszűnik (17.d ábra). A CDK kináz fehérje szintjét és aktivitását 1 mM L-NMMA a tenyésztés első 36

illetve 72 órájában is csökkenti, de a 96 órás periódus végén már nem. Sőt, a 96 órás mintákban a CDK aktivitás még magasabb is L-NMMA jelenlétében, mint az L-NMMA nélkül tenyésztett kontroll sejtekben.

Ahhoz, hogy nagyobb betekintést nyerjünk az L-NMMA tenyésztési időtől függő hatásának mechanizmusába, 24 órás eltolásokkal, 48 órás inhibitor kezelésnek tettük ki a protoplaszt eredetű sejteket 7 napon keresztül (18. ábra). A sejtciklus mérhető paraméterei közül az S fázison átesett sejtek számát határoztuk meg BrdU sejtmagba való beépülésének detektálásával. Minden 48 órás pulzus végén a Medsa;CDKA;1,2 aktivitását is meghatároztuk. Ha a protoplaszt eredetű sejtek L-NMMA kezelését a tenyésztés 72 órája előtt kezdtük meg, mindkét vizsgált paraméter csökkent. Az inhibitor jelenléte a tápoldatban a tenyésztési idő 72 és 120 órája között viszont serkentette a CDK aktivitását. A jelenség magyarázatát valószínűleg a sejtciklus előrehaladásában blokkolt sejtek gátlás alóli egyidejű felszabadulásában kell keresni, ami egyfajta szinkronizált sejtciklus reaktivációt eredményez. Végül, ha az inhibitor kezelést a tenyésztési idő 96 órája után kezdtük meg, semmilyen hatást nem tudtunk kimutatni.



**18. ábra.** Az L-NMMA (1mM) alkalmazásának tenyésztési időtől való függése a BrdU beépülése és a Medsa;CDKA;1,2 fehérje aktivitására lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtenyészetben.

Az L-NMMA kezelést 24 órás eltolásban 48 óráig tartó pulzusokban végeztük. A BrdU 30  $\mu$ M végkoncentrációban, az L-NMMA kezelés második 24 órás periódusa alatt volt a tápoldatban. A 48 órás L-NMMA kezelés végén begyűjtött mintákban határoztuk meg a feltüntetett paramétereket.

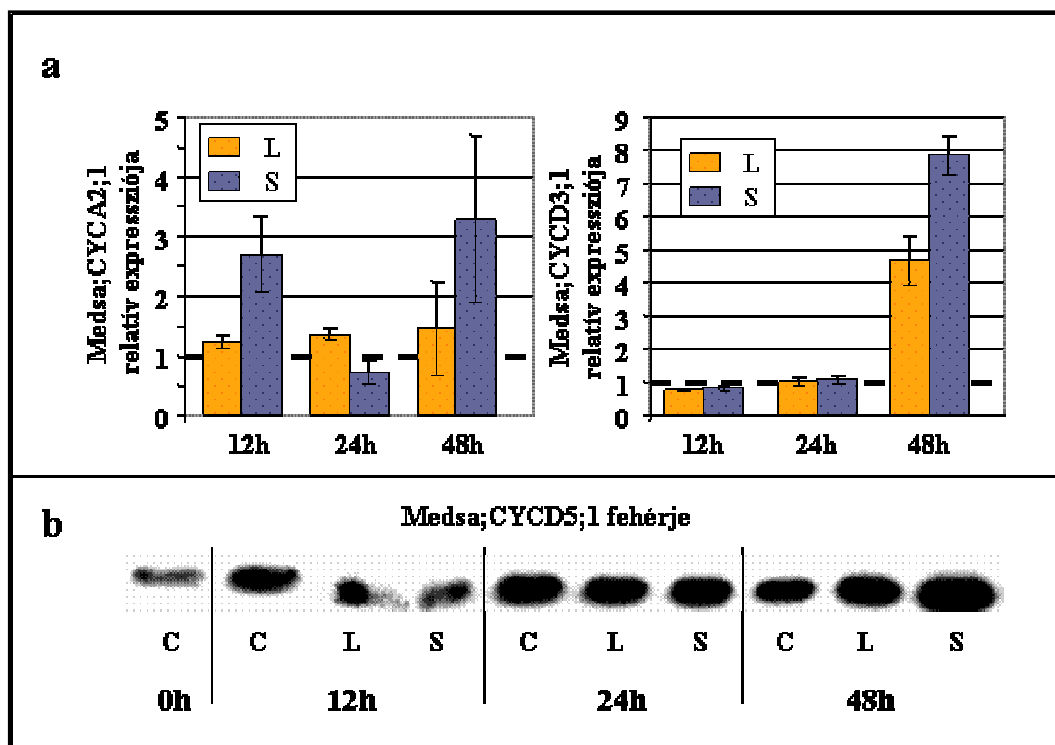
Az S fázis jellemzésére szolgáló BrdU-beépülési adatok esetében az átlagot és a normál szórást ábrázoltuk, mely adatok három független kísérlet eredményéből származnak. A protoplasztokat 1  $\mu$ M 2,4-D jelenlétében tenyésztettük.

### 5.2.5. NO hatása G1 ciklin gének expressziójára protoplaszt eredetű sejtekben

Az eddig ismertett eredményekből kitűnik, hogy az NO valamilyen módon hatással van a sejtciklus szabályozás egyik központi elemének, a Medsa;CDKA;1,2 fehérjének a szintjére és aktivitására. Annak eldöntésére, hogy a kináz aktivitás



csökkenéséért csak a CDK fehérje szintjének a változása felelős, vagy egyéb szabályozási lépések is megváltoznak NO hatására, figyelmünket a kináz aktivitásához szükséges ciklin partnerekre is kiterjesztettük. Az A és D típusú lucerna ciklineknek a sejtciklus korai fázisában, a sejtciklus aktiválásában ( $G_0/G_1$  átmenet) van szerepe (Dahl, M. 1995; Meskiene, I. 1995). Ahogy a 19.a ábrán látható, az A típusú Medsa;CYCA2;1 ciklin relatív expressziója 10  $\mu$ M SNP hatására megemelkedett a tenyésztés 12 és 48 órájában, de a 24. órára visszaesett. 1 mM L-NMMA-nak nem volt szignifikáns hatása a ciklin expressziójára. A Medsa;CYCD3;1 ciklin relatív expresszióját mindkét kezelés kis mértékben csökkentette 12 óránál, ami 24 óránál elérte a kontroll szintet, amit 48 óránál öt-nyolcszoros emelkedés követett (19.a ábra). Egy specifikus ellenanyagot használva képesek voltunk a Medsa;CYCD5;1 fehérje – ez a ciklin a Medsa;CDKA;1,2 kináz legerősebb kölcsönható partnerének bizonyult élesztő kettős hibrid rendszerben (Mészáros, T. 2000) – szintjének meghatározására a kezelt sejtekben (19.b ábra). Hasonlóan a Medsa;CYCD3;1 transzkriptum változásaihoz, a D típusú ciklin fehérje szintjét is mindkét kezelés csökkentette a kezelés első 12 órájában, majd elérte a kontroll szintet 24 óránál és jelentős emelkedést figyelhattunk meg 48 óránál.



19. ábra. NO hatása G1 ciklin gének kifejeződésére levélprotoplaszt eredetű sejtekben.

(a) Az A típusú lucerna ciklin (Medsa;CYCA2;1) és a D típusú lucerna ciklin (Medsa;CYCD3;1) relatív transzkriptum szintjének meghatározása valós idejű kvantitatív PCR-val, 1 mM L-NMMA (L) ill. 10 μM SNP (S) jelenlétében tenyésztett sejtekben. A normalizálás egy aktin gén kifejeződésére történt. Az ábrán három kísérlet átlaga látható szórásokkal feltüntetve.

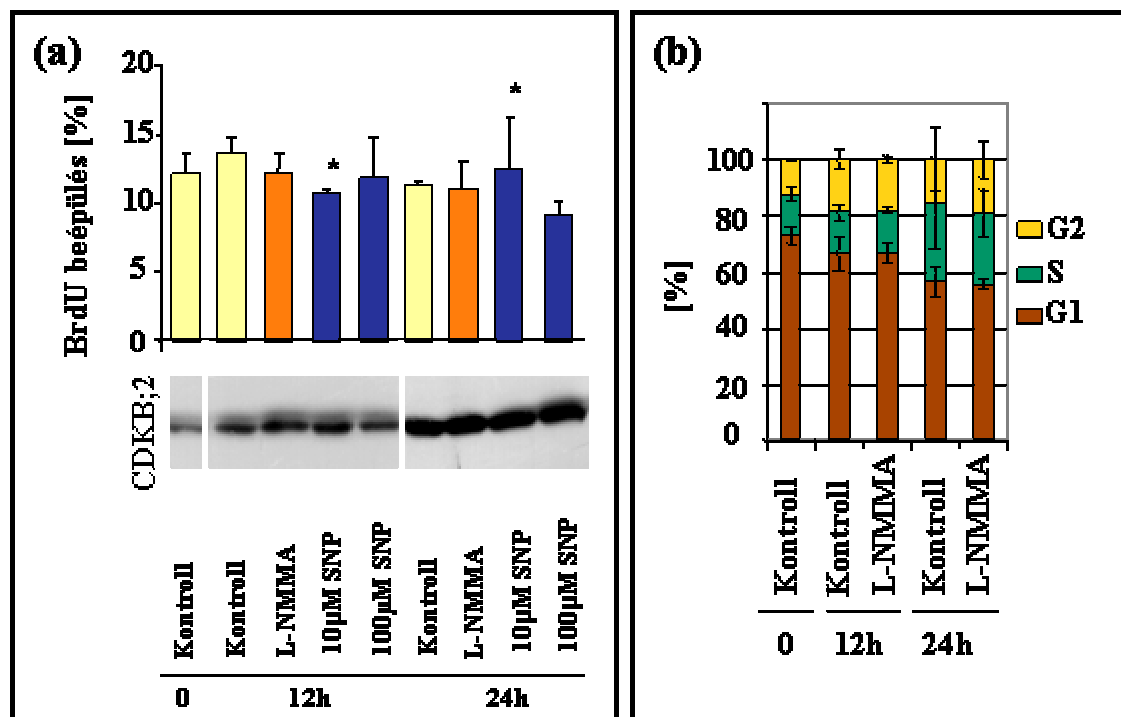
(b) A D típusú lucerna ciklin (Medsa;CYCD5;1) fehérje szintjének detektálása fehérje kivonatban a ciklin C-terminális végére tervezett, affinitás tisztított, peptid ellenanyaggal. C, kontroll; L, 1 mM L-NMMA; S, 10 μM SNP.

#### 5.2.6. Az NO nem befolyásolja a sejtciklus progressziót exponenciálisan növekvő lucerna sejtuszpenzióban

A NOS inhibitorral végzett kísérleteinkből kiderült, hogy a protoplaszt eredetű sejtek érzéketlenné váltak az L-NMMA kezelésre a tenyésztés harmadik napjára, amikor a sejtek többsége már belépett első osztódási ciklusába. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a NOS gátlószer L-NMMA hogyan hat egy folyamatosan osztódó dedifferenciálódott sejt kultúrára. A felmerült kérdés megválaszolásához a

protoplaszt izoláláshoz használt lucerna genotípusból (*Medicago sativa ssp. varia A2*) származó gyorsan növe sejt kultúrát választottunk.

Az NO donor SNP 10 és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban sem hatott a BrdU beépülés mértékére, sem a Medsa;CDKB;2,1 fehérje mitotikus felhalmozódására (20.a ábra). Irodalmi adatok szerint a Medsa;CDKB;2,1 fehérje elsősorban a sejtciklus M fázisában halmozódik fel, így jól használható mitotikus markerként (Magyar,Z. 1997;Mészáros,T. 2000; Mészáros,T. 2000). Hasonló eredmény született a NOS gátlószer alkalmazásakor is. Az L-NMMA 1 és 10 mM koncentrációban sem befolyásolta a lucerna sejtek osztódási paramétereit. A 20.a ábra tanúsága szerint még relatív magas, 10 mM L-NMMA sem befolyásolja a BrdU sejtmagba való beépülését és a Medsa;CDKB;2,1 mitózis specifikus akkumulációját sem. A sejtek relatív DNS tartalma sem változott L-NMMA kezelésre (20.b ábra).



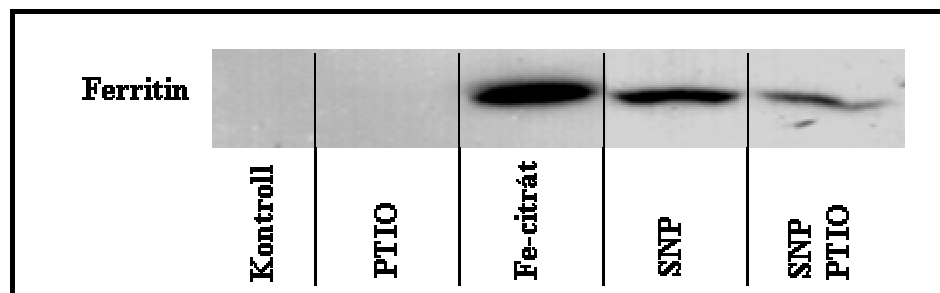
20. ábra. Az NO donor SNP és a NOS inhibitor L-NMMA hatása exponenciálisan növekvő lucerna sejt kultúra sejtciklusának progressziójára.

(a) A lucerna sejt kultúra passzálását követő harmadik napon a szuszpenzió sejtjeit 24 órás SNP (100  $\mu$ M) és L-NMMA (1 mM) kezelésnek vetettük alá. A 24 órás periódus végén meghatároztuk a sejtek S fázisos gyakoriságát (BrdU beépülés vizsgálatával) és a mitózis specifikus Medsa;CDKB;2,1 kináz akkumulációját.

(b) A 10 mM L-NMMA-val kezelt sejtekből izolált sejtmagok relatív DNS tartalma áramlásos citometriás méréssel meghatározva.

Kísérleteinket három ismételtsben végeztük el (\* két ismételést jelöl) és az átlagokat szórással ábrázoltuk.

Annak érdekében, hogy eldönthessük, hogy a vizsgált sejtciklus paraméterek változatlansága a szuszpenziós kultúrában tenyésztett lucerna sejtek NO inszenzitivitásának a következménye vagy sem, a szuszpenziót 2-3 hétig vas hiányában tenyésztettük, hogy markerként használhassuk a ferritin fehérje felhalmozódását. Murgia és munkatársai ugyanis kimutatták, hogy a vas, éppenúgy, mint az NO donor SNP, képes NO függő mechanizmus által indukálni a ferritin gén expresszióját vas éheztetett Arabidopsis sejt kultúrában (Murgia, I. 2002). A vas 2-3 hétig tartó megvonása a lucerna sejt kultúra táptalajából, sem a sejtek növekedési rátáját sem a sejtciklus progresszióját nem befolyásolta, áramlásos citometriás relatív DNS tartalom mérés és az ülepített sejtterfogat meghatározása alapján. Egy, a lucerna ferritin fehérje ellen termeltetett, specifikus poliklonális ellenanyag használatával igazoltuk (Deák, M. 1999), hogy a vas éheztetett lucerna sejt kultúrákban a ferritin fehérje szintje nem detektálható szintre csökkent (21. ábra).

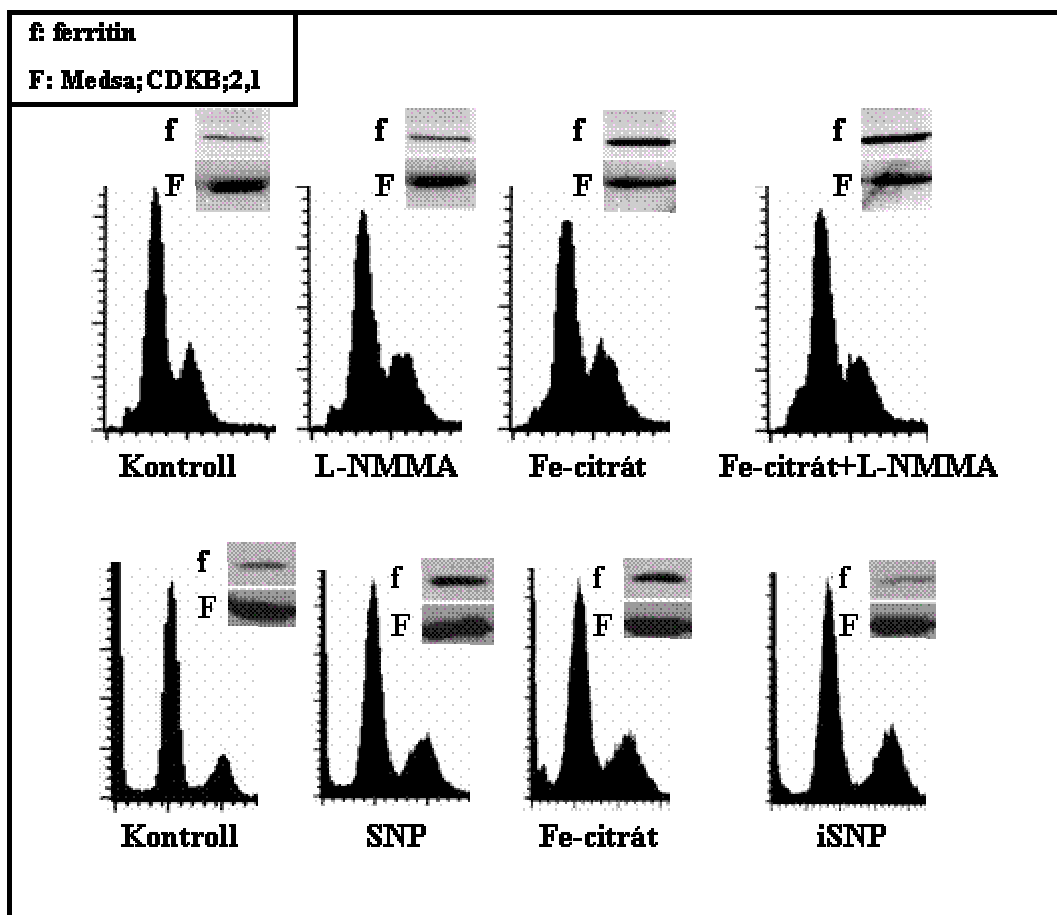


**21. ábra. Lucerna ferritin fehérje szintjének detektálása vas éheztetett sejt kultúrában PTIO, Fe-citrát és SNP hatására.**

500  $\mu$ M Fe-citrát és 100  $\mu$ M SNP képes volt ferritin akkumuláció indukálására. Ugyanakkor 200  $\mu$ M PTIO csökkentette az SNP által előidézett ferritin akkumulációt.

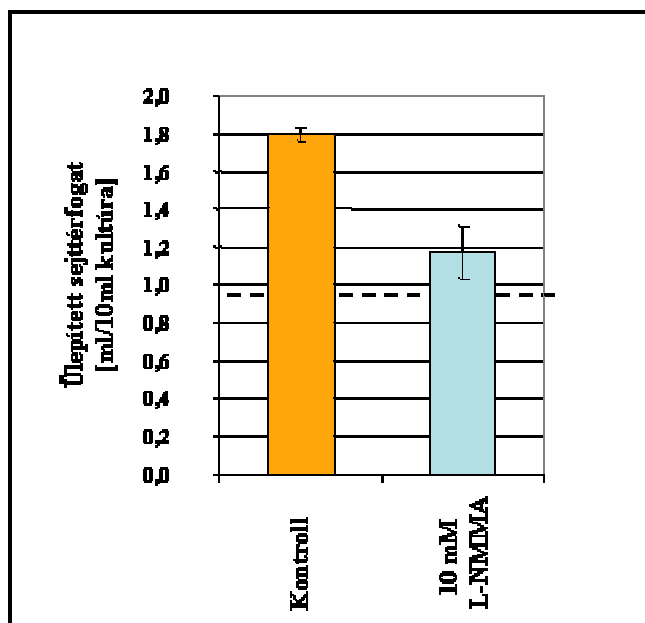
100  $\mu$ M SNP viszont már elegendőnek bizonyult a ferritin fehérje indukációjához a vas éheztetett lucerna sejt kultúrában (21. ábra). A detektált jel az NO fogó (PTIO) egyidejű alkalmazásával csökkenthető (21. ábra), ami a ferritin termelés NO-függésére utal. Elmondható tehát, hogy a sejt szuszpenzió sejtjei képesek specifikus választ adni az SNP kezelésre.

Kezeléseinket ezért elvégeztük a vas éheztetett sejt kultúrában. Megállapítható, hogy sem 500  $\mu$ M Fe-citrát vagy 10 mM L-NMMA, sem 100  $\mu$ M SNP/iSNP nem befolyásolta szignifikánsan a sejtciklus fázisainak arányát és a Medsa;CDKB;2,1 fehérje szintjét (22. ábra).



22. ábra. L-NMMA, Fe-citrát, SNP és iSNP hatása vas éheztetett sejtek relatív DNS tartalmára valamint a ferritin és a Medsa;CDKB;2,1 fehérje akkumulációjára.

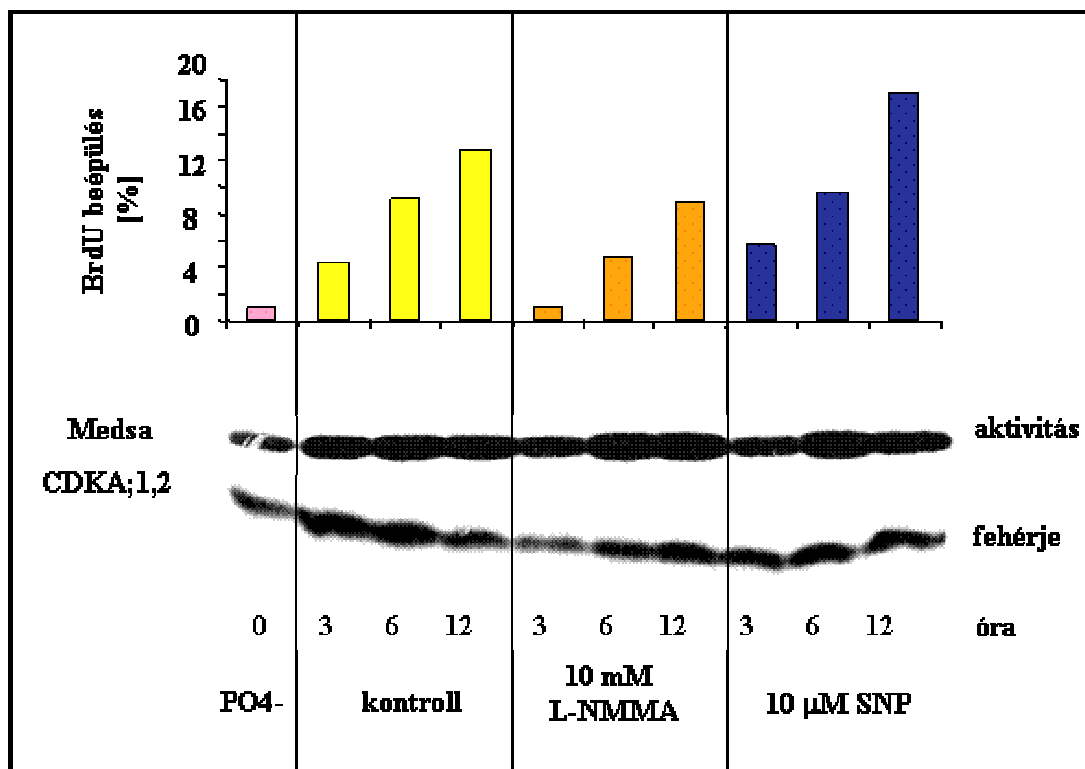
A sejtciklus progressziójának nyomonkövetése mellett feljegyeztük a négy napos kezelt (10 mM L-NMMA, 100  $\mu$ M SNP) és nem kezelt lucerna sejtszuszpenzió ülepített sejtterfogátát. Szignifikáns különbséget azonban nem tudtunk kimutatni. Mindazonáltal ha méréseinket stacionárius állapotú (11 napos) sejt kultúrán végeztük el, 10 mM L-NMMA hatására a sejtek növekedési rátája valamelyest csökkent a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva a tápoldat frissítését követően (23. ábra).



**23. ábra.** 11 napos stacionárius állapotban lévő lucerna sejtkultúra szaporodása 10 mM L-NMMA jelenlétében.

Az ülepített sejttérfogatot a kezelést követő ötödik napon mértük. A kiindulási sejttérfogatot szaggatott vonal jelzi (0.95 ml sejt 10 ml kultúrában).

A NOS inhibitor és NO donor kezeléseket elvégeztük foszfát éheztetett lucerna sejtkultúrán is. A foszfát éheztetés egy széleskörben elfogadott módja sejtkultúrák szinkronizálására a sejtciklus  $G_0/G_1$  fázisában (Dahl, M. 1995; Kapros, T. 1992; Meskiene, I. 1995). A sejtek sejtciklusának egyidejű újraindulását foszfát hozzáadásával idézhetjük elő. Kettős foszfát éheztetéses technikával az osztódó lucerna szuszpenzió sejteire jellemző 5-6 %-os S fázis arányt le tudtuk csökkenteni 1 %-ra (24. ábra). Ezzel párhuzamosan a Medsa;CDKA;1,2 aktivitása és fehérje szintje is lecsökkent (24. ábra). Foszfát pótlása a rendszerben a normál szintre állította vissza az S fázis arányát és a Medsa;CDKA;1,2 fehérje szintjét és aktivitását. Ha a foszfát éheztetett szuszpenzióhoz a foszfát pótlásával párhuzamosan 10 mM L-NMMA-t is adunk, a sejtek sejtosztódási ciklusba való belépése kb. 3 órát késett. 10  $\mu$ M SNP hasonlóképpen történő adagolása pedig kis mértékben növelte a vizsgált sejtciklus paraméterek értékét.



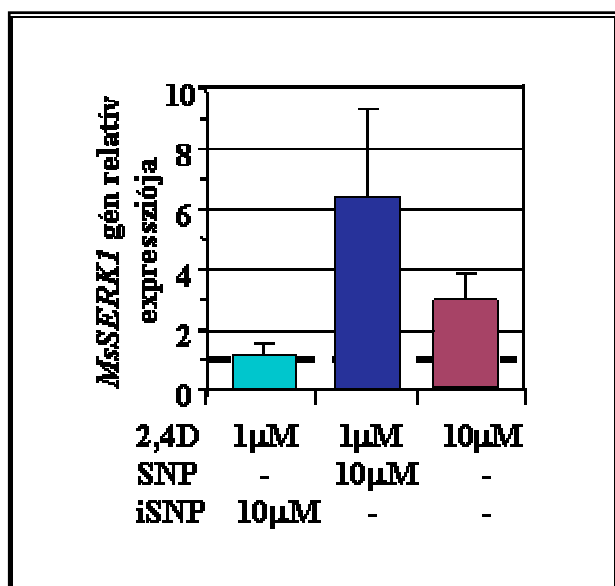
24. ábra. A NOS inhibitor (L-NMMA) és az NO donor (SNP) hatása a sejtosztódás reaktivációjára foszfát éhezettett lucerna sejtszuspenzióban.

Áramlásos citometriás méréssel meghatározott S fázis arány és a Medsa;CDKA;1,2 fehérje szintje és a H1 hisztont foszforiláló aktivitása foszfát éhezettett lucerna szuspenzióban és a foszfát pótlását követően 3, 6 és 12 órával, 10 mM L-NMMA vagy 10 μM SNP alkalmazásával illetve anélkül.



### 5.3. Az NO hatása lucerna protoplaszt eredetű sejtek differenciációjára, morfogenezisére

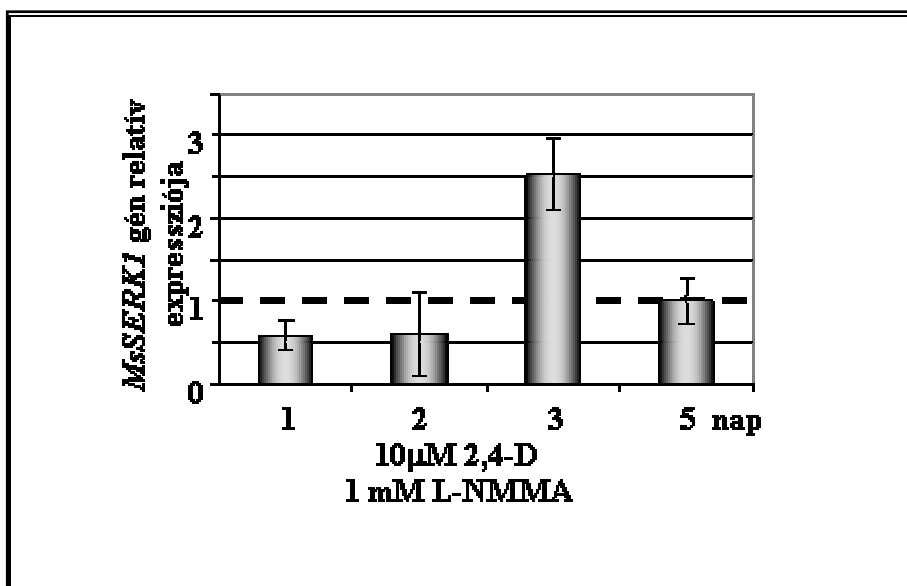
Irodalmi adatok igazolták, hogy ha lucerna levélprotoplasztokat magas koncentrációjú ( $10\ \mu\text{M}$ ) 2,4-D szintetikus auxinnal kezelünk a sejtek kis, izodiametrikus, sűrű citoplazmával rendelkező embriogén sejtekké alakulnak át, melyek asszimmetrikusan osztódnak és embriogén markereket fejeznek ki (Bögre, L. 1990; Dudits, D. 1991; Pasternak, T.P. 2000). A 19. ábrán látható, hogy nem csak  $10\ \mu\text{M}$  2,4-D jelenlétében, hanem  $1\ \mu\text{M}$  2,4-D és  $10\ \mu\text{M}$  SNP együttes alkalmazása esetén is a protoplasztokból fejlődő sejtkolóniák morfológiája embriogén típusú, bennük az *MsSERK1* gén – ami egy szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) fehérjét kódol (Nolan, K.E. 2003) – relatív expressziója jóval magasabb, mint a csupán  $1\ \mu\text{M}$  2,4-D szintetikus auxinnal kezelt sejtekben (25. ábra).



25. ábra. A szomatikus embriogenezishez kapcsolt *MsSERK1* gén relatív expressziójának változása az NO donor SNP hatására lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben.

Az *MsSERK1* expressziót egy aktin gén kifejeződésére normalizáltuk. 5 napos sejtekben vizsgáltuk a relatív génkifejeződést valós idejű kvantitatív PCR-val. Az ábrán három kísérletből származó átlagos értékeket mutatjuk a szórásokkal.

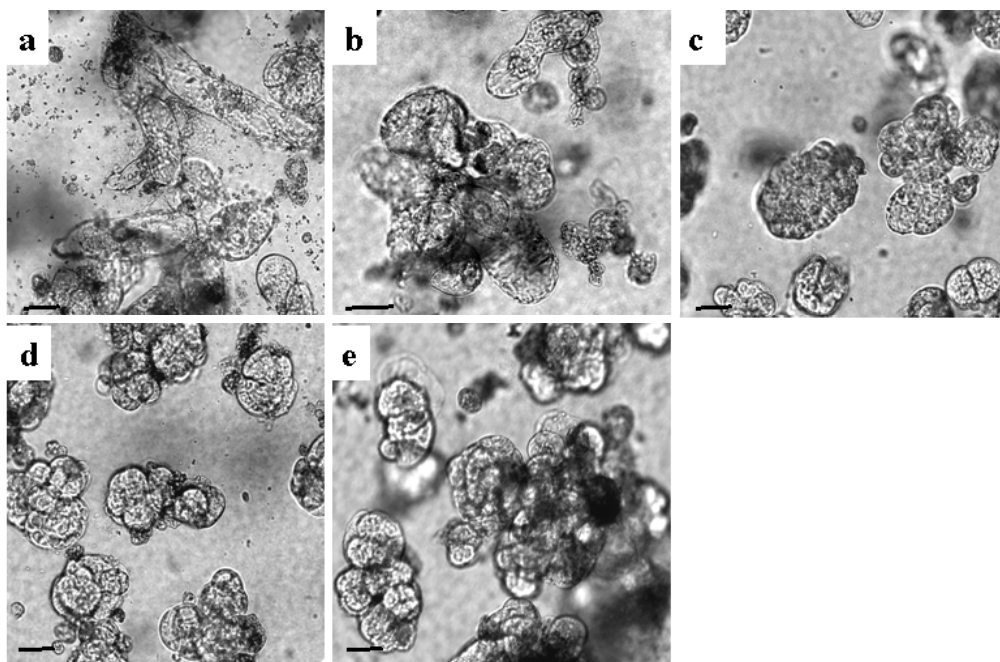
Kísérleteink során azt is tapasztaltuk, hogy az L-NMMA 1 mM koncentrációban gátolta az embriogén típusú sejtek kialakulását, még magas 10  $\mu$ M 2,4-D alkalmazása esetén is (26. ábra). Azonban, ahogy az *MsSERK1* gén transzkriptum szintjének változása mutatja, az L-NMMA embriogén sejtek kialakulását gátló hatása feltehetően tranziens. Az *MsSERK1* mRNS szintje L-NMMA hatására csökken a tenyésztés második napján, kb. háromszorosára nő a harmadik napon, az ötödik napra pedig visszaesik a kontroll sejtekben detektált szintre (26. ábra). Az expressziós adatok egybevágnak az embriogén sejtcsoportok megjelenésével, ugyanis az inhibítorral kezelt sejtenyésztetben 10  $\mu$ M 2,4-D jelenlétében 15 nappal a tenyésztés kezdetét követően valóban embriogén típusú sejtek figyelhetők meg (27. ábra). Az embriogén sejtek kialakulása azonban késést szenved, melynek mértéke kb. 2 napra tehető.



26. ábra. A NOS inhibitor L-NMMA hatása az embriogén marker gén *MsSERK1* relatív expressziójára.

Az *MsSERK1* gén expresszióját aktin gén kifejeződésére normalizáltuk, a kísérleteket három ismételtsben végeztük és az ebből kapott átlagot és a szórásokat ábrázoltuk.

Kíváncsiak voltunk a kezelt sejtek további sorsára, ezért az 1 és 10  $\mu\text{M}$  2,4-D és 10  $\mu\text{M}$  SNP vagy 1 mM L-NMMA jelenlétében vagy jelenléte nélkül nevelt sejteket 5 nap után alacsony auxin [0.36  $\mu\text{M}$  indol ecetsav (IES)] tartalmú agaróz mediumba ágyaztuk. Ilyen körülmények között az eredetileg 10  $\mu\text{M}$  2,4-D vagy 1  $\mu\text{M}$  2,4-D és 10  $\mu\text{M}$  SNP együttes jelenlétében nevelt sejtek proembriogén sejthalmazokat alkottak, melyek sejtjei kis, izodiametrikus, sűrű citoplazmás sejtekből álltak (27. ábra). Az eredetileg 1  $\mu\text{M}$  2,4-D vagy az 1  $\mu\text{M}$  2,4-D és 10  $\mu\text{M}$  iSNP jelenlétében tenyésztett sejtek azonban megnagyobbodott, erősen megnyúlt sejtekből álló csoportokat alkottak.



**27. ábra.** Az NO donor SNP (10  $\mu\text{M}$ ) és a NOS inhibitor L-NMMA (1 mM) hatása embriogén sejtcsoportok kialakulására lucerna levél-protoplaszt eredetű sejtekből.

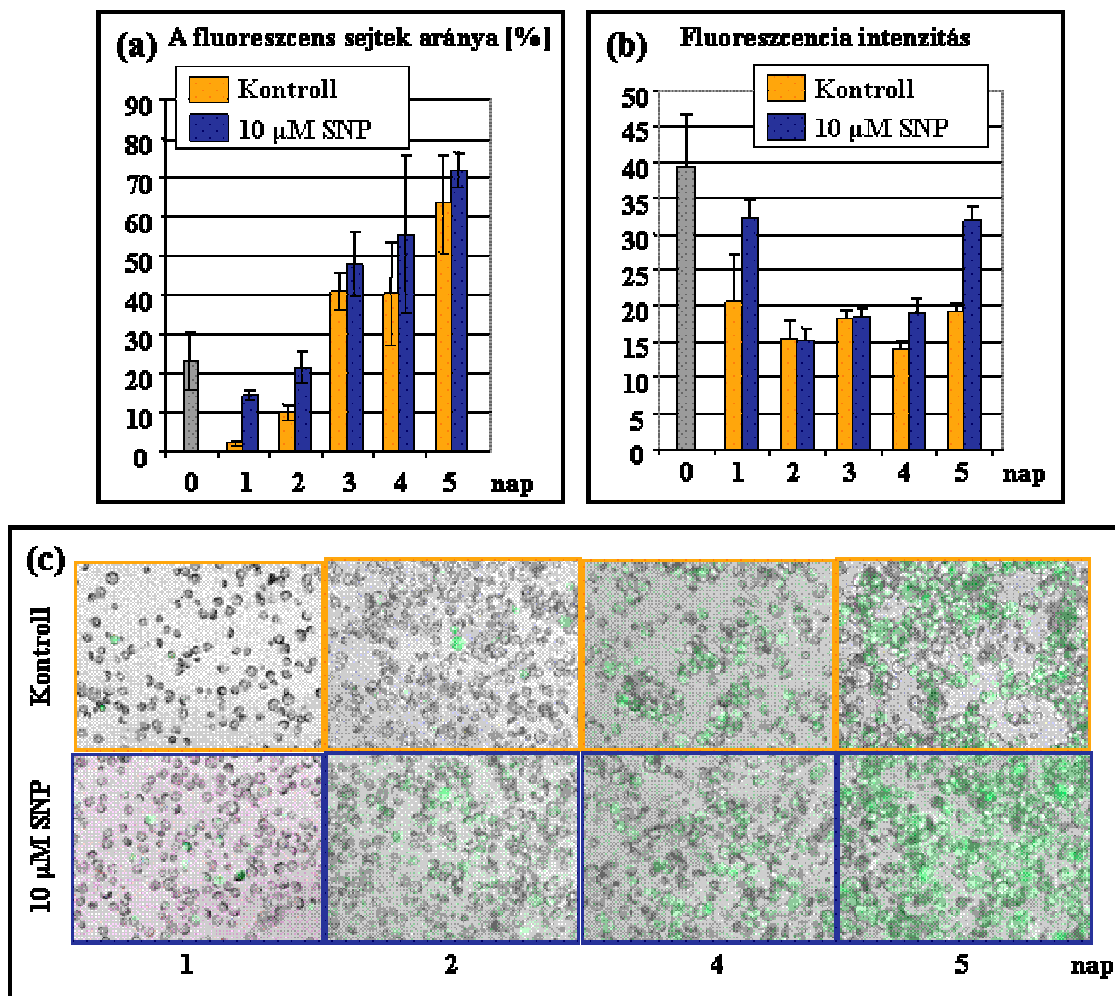
A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejteket 1  $\mu\text{M}$  2,4-D (a), 1  $\mu\text{M}$  2,4-D és 10  $\mu\text{M}$  inaktívált SNP (b), 10  $\mu\text{M}$  2,4-D (c), 1  $\mu\text{M}$  2,4-D és 10  $\mu\text{M}$  SNP (d), valamint 10  $\mu\text{M}$  2,4-D és 1 mM L-NMMA (e) jelenlétében

öt napig tenyésztettük majd 0.36  $\mu\text{M}$  IES jelenlétében alacsony olvadáspontú agarózba beágyaztuk. A képek egy héttel az agarózba való beágyazás után készültek.

#### 5.4. Az NO detektálása protoplaszt eredetű sejtekben

Feltételeztük, hogyha az NO illetve egy NOS-szerű enzim szerepet játszik a levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódásának reaktivációjában, akkor ezt a nitrogén oxid szint sejten belüli változásai kísérik. Ezért erőfeszítéseket tettünk annak érdekében, hogy meghatározzuk az NO sejten belüli koncentrációját a kontroll és a kezelt protoplaszt eredetű sejtekben egyaránt. A legkivitelezhetőbb megoldásnak egy mikroszkópos megközelítés, az NO szenzitív fluoreszcens festék 4,5-diaminofluoreszcein diacetát (DAF-2DA) használata mutatkozott (Kojima, H. 1998), ez a festék ugyanis képes a nitrogén oxid egyedi sejtekben való kimutatására.

Az NO donor SNP-vel kezelt protoplaszt eredetű sejtpopulációból öt napon keresztül, naponta mintákat vettünk. A mintákat az „Anyagok és módszerek” fejezetben ismertetett módon DAF-2DA fluoreszcens festékkel festettük, majd róluk fluoreszcens mikroszkóp (Nikon Eclipse TE 300), CCD kamera [SPOT RT Color CCD Camera (Diagnostic Instruments, Inc., USA)] és egy softwer (SPOT, Version 3.2.4, Diagnostic Instruments, Inc., USA) segítségével felvételeket készítettünk (28.c ábra). Minden egyes felvétel egyforma paraméterekkel (expozíció, felbontás) készült. A fluoreszcens sejtek gyakoriságát, mintánként kb. 500 sejtben egy, Szűcs Attila (MTA SZBK) által készített software-rel határoztuk meg. A fluoreszkáló sejtekben a fluoreszcencia intenzitását az Image J (Image Processing and Analysis in Java, Research Services National Institute of Mental Health, USA) programmal állapítottuk meg. Eredményeinket a 28. ábrán mutatjuk be.



**28. ábra. Az NO donor SNP hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek DAF-2 DA fluoreszcenciájára.**

(a) Az adott sejtpopulációban fluoreszkáló sejtek aránya a tenyésztés 1-5 napján.

(b) A fluoreszkáló sejtekben a fluoreszcencia intenzitása (önkéntesen választott egységekben kifejezve) a tenyésztés 1-5 napján.

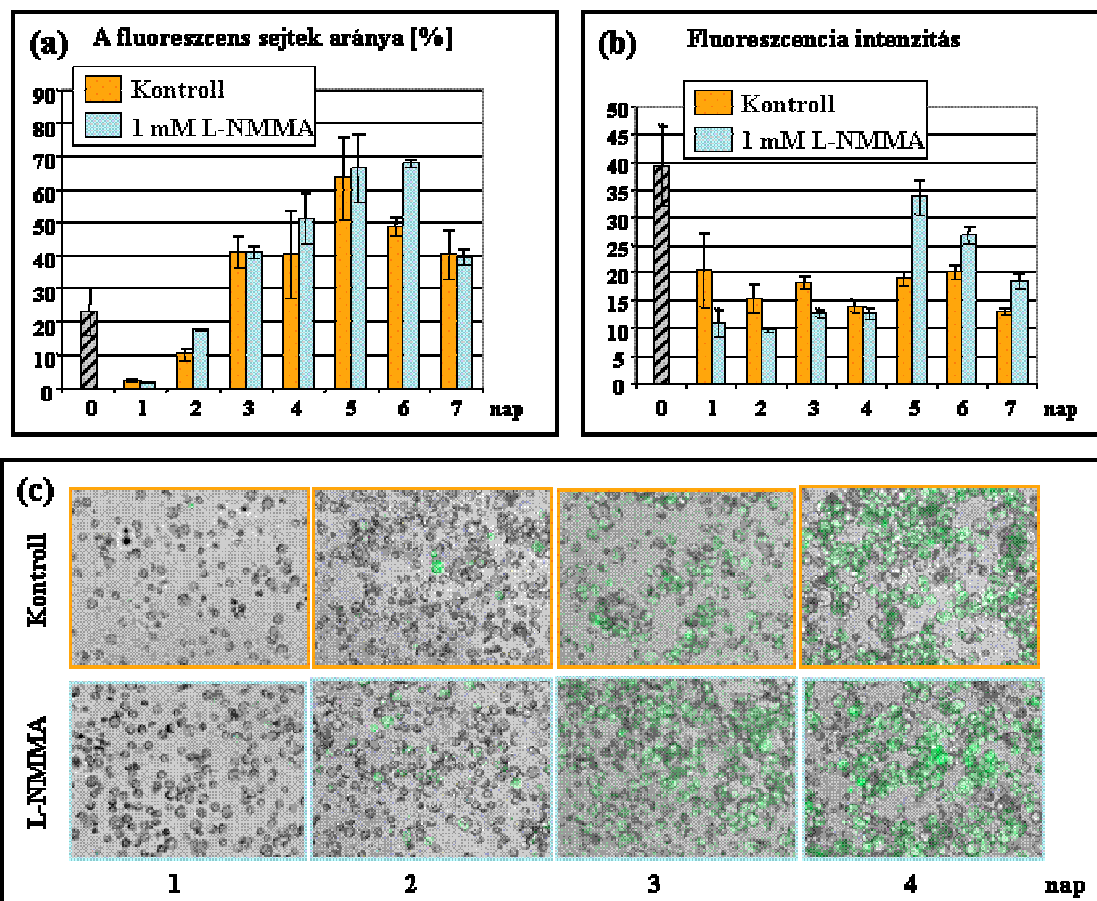
A 0 napos érték közvetlenül a protoplasztálás utáni állapothoz rendelhető adat.

(c) Mikroszkópos felvételsorozat amely a protoplaszt eredetű sejtekről áteső fényben és a DAF-2 DA fluoreszcencia gerjesztését követően készített felvételeket együttesen mutatja.

Mint ahogy a 28.a ábrán látható, az adott sejtpopulációban található fluoreszkáló sejtek gyakorisága a tenyésztési idő függvényében változik. Feltételezhető, hogy csak

azokban a sejtekben észlelhető fluoreszcencia, melyekben eléri az NO szint a DAF-2 DA detektálási határértékét ( $> 5 \text{ nmol L}^{-1}$ ). A kontroll sejtek esetében a frissen izolált protoplasztok kb. 25 %-ban tapasztalható intenzív fluoreszcencia (28. a és b ábra, 0 nap), valószínűleg az izolálási stressznek köszönhetően. 1 nap elteltével azonban, már alig láthattunk fluoreszcens sejtet a kontroll sejtpopulációban. A további tenyésztés során szignifikáns emelkedést észlelhattunk a fluoreszcens sejtek gyakoriságában. A kontroll tenyészetben detektált fluoreszcens intenzitás hozzávetőleges értéke a frissen izolált protoplasztokban volt a legmagassabb, majd 1 nap elteltével ez az érték kb. a felére csökkent és a továbbiakban sem változott.  $10 \text{ }\mu\text{M}$  SNP jelenlétében megnőtt a sejtpopulációban található fluoreszcens sejtek aránya. A fluoreszcens intenzitás tekintetében viszont csak a tenyésztés első és ötödik (az osztódási fázis kezdete) napján detektáltunk növekedést.

Az előzőekben leírt mintavételezési eljárást megismételtük  $1 \text{ mM}$  L-NMMA jelenlétében tenyésztett protoplaszt eredetű sejtpopulációban is (29. ábra). A NOS gátlószer L-NMMA nem befolyásolta szignifikánsan a sejttenyészetben található fluoreszkáló sejtek számát, de kismértékben csökkentette a fluoreszcencia intenzitását a tenyésztés 24-96 órájáig és növelte azt a 120. órában, mely eredmény egybevág az L-NMMA-nak ezekre a sejtekre gyakorolt korábban ismertetett hatásával (17. és 18. ábra).



29. ábra. A NOS gátlószer L-NMMA hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek DAF-2 DA fluoreszcenciájára.

(a) Az adott sejtpopulációban fluoreszkáló sejtek aránya a tenyésztés 1-7 napján.

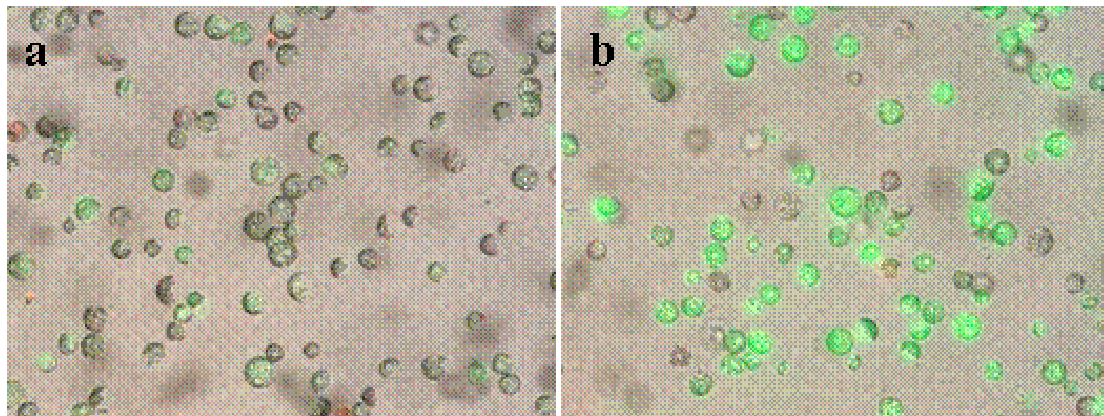
(b) A fluoreszkáló sejtekben a fluoreszcencia intenzitása (hozzávetőleges értékben kifejezve) a tenyésztés 1-7 napján.

A 0 napos érték közvetlenül a protoplasztálás utáni állapothoz rendelhető adat.

(c) Mikroszkópos felvételsorozat amely a protoplaszt eredetű sejtekről áteső fényben és a DAF-2 DA fluoreszcencia gerjesztését követően készített felvételeket együttesen mutatja.

A DAF-2 DA használatával, mint bemutattuk, a protoplaszt eredetű sejtek egy részében detektáltunk fluoreszcenciát, azonban a festék egy NO inszenzitív analógjának, 4-aminofluorescein diacetát, alkalmazásával a sejtek szinte mindegyikében nagyon intenzív fluoreszcenciát észleltünk (30. ábra), ami kérdésessé

tette a megfigyelt fluoreszcencia specifitását (NO függését), ezért további kísérleteinkben mellőztük a DAF-2 DA használatát.



**30. ábra. Az NO fluoreszcens detektálása lucerna protoplasztokban.**

(a) DAF 2DA fluoreszcens festék használata lucerna protoplasztokban.

(b) 4-aminofluorescein diacetát fluoreszcens festék használata lucerna protoplasztokban.



## 6. Eredmények értékelése

### 6.1. Az NO szerepet játszik a sejtosztódás aktivációjában, de nem annak progressziójában

A sejtosztódás és a differenciáció tanulmányozásának egyik legjobb *in vitro* kísérleti rendszere, a sejtfal nélküli egyedi növényi sejtek pl. a levélszövetből izolált protoplasztok szintetikus táptalajban tenyésztett sejt kultúrája. Noha a protoplaszt izolálás során a sejtek kétség kívül nagyfokú stressznek vannak kitéve, kísérleti bizonyítékok demonstrálják, hogy a megfelelően kezelt protoplasztok gyorsan visszanyerik az ép sejtekre jellemző tulajdonságokat és hasonlóképpen reagálnak a hormonális és stresszhatásokra, mint teszik azt intakt társaik (Pasternak, T.P. 2002; Sheen, J. 2001).

Kísérleti eredményeink alapján, miszerint a NOS inhibitor L-NMMA és az NO fogó PTIO csökkentette, az NO donor SNP és társai pedig serkentették a lucerna protoplaszt eredetű sejtek S fázis frekvenciáját és osztódását elmondható, hogy a nitrogén oxid szerepet játszik a levélszövetek dedifferenciációjához ill. osztódásához vezető jelátviteli kaszkádban. A fenti hatás határozottan NO dependens, hisz az L-NMMA gátolt BrdU beépülés és a Medsa;CDKA;1,2 kináz aktivitás csökkenése SNP kezeléssel revertálható. Az SNP hatása koncentráció függő, 1 és 10  $\mu\text{M}$  elősegíti, míg 100  $\mu\text{M}$  már gátolja a DNS replikációját. Az NO koncentrációfüggő hatása növényi és állati rendszerekben sem ismeretlen. NO donorok például aktiválják a tengeri sün petesejtjét, de csak egy bizonyos koncentrációban, ennél magasabb koncentráció alkalmazása még a spermium sejt-mediált aktiválását is gátolja (Kuo, R.K. 2000). Növényekben nagy mennyiségű NO gátolja, míg kis mennyiségű serkenti a levél expanzióját és a növény növekedését (Beligni, M.V. 2001; Lamattina, L. 2003; Neill, S.J.

2003; Seregélyes,Cs. 2003). Az NO dózis függő hatását a 2.3.2. fejezetben tárgyaltak szerint a molekula fizikai és kémiai tulajdonságaival magyarázhatjuk.

Dedifferenciáció során egymást részben átfedő módon követi egymást az izolációval járó stresszhatások lecsengése, a sejtfallszintézis aktiválódása, a differenciált funkciók elvesztése és a sejtciklus gépezet elindulása (Fehér,A. 2002). Az azonban nem tisztázott, hogy az NO melyik lépést milyen módon befolyásolja. A 24 órás eltolásban 48 óráig végzett L-NMMA kezelés tanulsága szerint, csak a három naposnál fiatalabb protoplaszt eredetű sejtek voltak érzékenyek a NOS inhibitor jelenlétére. Ezeknek a sejteknek a kezelése a sejtciklus S-fázisába való belépést késleltette. Mindez azt jelezheti számunkra, hogy egy L-NMMA érzékeny folyamat megy végbe a lucerna levélprotoplaszt kultúra első három napja alatt és ez a mechanizmus szükséges ahhoz, hogy a sejtek belépessenek a sejtciklus S fázisba.

Azon célból, hogy igazoljuk feltételezésünket, megvizsgáltuk a Medsa;CDKA;1,2 kináz G1/S fázis specifikitást mutató aktivitását és fehérje szintjét, valamint az S fázis előtt (Dahl,M. 1995) ill. a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> átmenet során (Meskiene,I. 1995) aktiválódó ciklinek expresszióját, továbbá a korábban Mészáros és munkatársai által élesztő kettős hibrid rendszerben a Medsa;CDKA;1,2 kináz legerősebb interakciós partnereként jellemzett Medsa;CYC;D5,1 ciklin fehérje szintjének változását (Mészáros,T. 2000), az NO donor SNP és a NOS inhibitor L-NMMA jelenlétében. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy L-NMMA hatására specifikus gátlást nem tapasztaltunk a vizsgált ciklinek transzkripciójára vagy akkumulációjára, ugyanakkor expressziójuk jelzi a sejtosztódási ciklus elindulását. A ciklinek 48 órás időpontban megfigyelt megemelkedett szintje azt sejteti, hogy a kezelt sejtek ekkor már osztódási ciklusukban (G1) voltak. Az L-NMMA jelenlétében fenntartott protoplaszt eredetű sejtekben is megfigyelhető megemelkedett CDK aktivitás és a *SERK* gén expressziója a

tenyésztés harmadik napján. Érdeemes megjegyezni, hogy a protoplaszt kultúrák esetében a tenyésztés harmadik napja az az időpont, mikor endogén IES és S fázis csúcsot figyelhetünk meg, ugyanakkor pontosan ez az embriogén sejtsors felé való elkötelezettség időszaka is (Pasternak,T.P. 2000; Pasternak,T.P. 2002). Valószínűsíthető, hogy az L-NMMA nem blokkolja, hanem csak lelassítja a sejtciklus aktivációját, ami a sejtek sejtosztódási ciklusba való szinkronizált belépéséhez vezet. Ezt jelzi a vizsgált sejtciklusfüggő gének ill. proteinek transzkriptum/fehérje/aktivitás szintjében észlelt emelkedés a harmadik-negyedik napon. Amint a sejtek átjutnak az S fázison, a sejtek nem érzékenyek többé a NOS inhibitorra.

Az L-NMMA-nak dedifferenciációban során megfigyelt pontos hatásmechanizmusának megértéséhez és a fenti feltevések bizonyításához azonban további kísérletek elvégzése szükséges.

Ahogy az L-NMMA nem befolyásolta a három napnál idősebb levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklus progresszióját, úgy a folytosan osztódó ugyanazon lucerna genotípusból származó sejtuszuspenzióét sem, de késleltette a foszfátéheztetett és a stacionárius (11 napos) állapotban lévő sejtek sejtciklusba való belépését. 10 és 100  $\mu\text{M}$  SNP sem befolyásolta a lucerna szuszpenziósejtek sejtciklus progresszióját. Ugyanakkor a sejtek NO érzékenységét (100  $\mu\text{M}$  SNP) vaséheztetett sejt kultúrában a ferritin fehérje felhalmozódásával bizonyítani tudtuk, tehát az NO-ra kapott sejtciklus válasz hiánya nem a sejtek általános NO inszenzivitásának a következménye. Noha az SNP kezelésre foszfátéheztetett ill. 11 napos sejt kultúra esetén sem figyelhattunk meg a sejtciklus progresszióban megnyilvánuló választ, az okot ebben az esetben feltehetően a kísérleti rendszerben kereshetjük. A foszfátéheztetett sejtek sejtciklusba való belépése (reaktivációja) igen gyors, ami nem feltétlenül teszi lehetővé a változások megfelelő mértékű nyomon követését.

A megfigyelés, miszerint sem az osztódó levélprotoplasztok sem az osztódó szuszpenziósejtek nem érzékenyek L-NMMA kezelésre azt bizonyítja, hogy a növényeknek nincs szükségük L-NMMA szenzitív enzim aktivitásra a sejtosztódás fenntartásához.

## **6.2. Az NO szerepet játszik a 2,4-D által indukált embriogén sejtcsoportok kialakításában**

A növények az állatokhoz viszonyítva különlegesen nagyfokú egyedfejlődési plaszticitással rendelkeznek. Ennek egyik legfigyelemre méltóbb példája, hogy a szomatikus növényi sejtek képesek visszanyerni osztódási képességüket, majd a dedifferenciált sejtek megfelelő körülmények között szomatikus embriókká differenciálódva teljes növénné is fejlődhetnek. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy az NO az auxinnal karöltve fontos szerepet játszik ezen fázisváltásokban (dedifferenciáció/redifferenciáció).

Az NO donor SNP-nek az auxin regulált *Aux28* gén relatív expressziójára gyakorolt negatív hatása lucerna protoplaszt eredetű sejtekben is azt mutatja, hogy az NO befolyásolja az auxin által szabályozott szignalizációs utat. Az *Aux28* gén terméke egy transzkripciós faktor, mely az auxin indukált Aux/IAA fehérjék családjába tartozik (Vanneste,S. 2005). A fehérje funkciójáról nem tudunk sokat, de annyi bizonyos, hogy a korai auxin válasz gének repressziójáért felelős alacsony auxin koncentráció jelenlétében. A repressziót az auxin válasz faktorok (ARFs, „auxin response factors”) transzkripciós faktorok aktivitásának gátlásával éri el, így azok nem képesek az auxin indukált gének promotereiben található AuxRE („auxin responsive promoter element”) motívumokhoz kötődni (Vanneste,S. 2005). Eredményünket, miszerint alacsony auxin koncentráció mellett 10  $\mu$ M SNP csökkenti az *Aux28* gén relatív expresszióját

értelmezhetjük úgy is, hogy az *Aux28* alacsony expressziója elősegíti az ARF transzkripció faktor represszió alóli felszabadulását, így beindulhat az auxin indukált gének kifejeződése. A bevezetésben már utaltunk arra, hogy a gyökér megnyúlásos növekedésében és a járulékos oldalgyökér képződésben az auxin és az NO valószínűleg közös jelátviteli utakon osztozik (Gouvea,C.M.C.P. 1997; Pagnussat,G. 2002; Pagnussat,G. 2004; Pagnussat,G. 2003). Uborka növényeken az IES kezelés endogén NO termelést indukál, a formálódó gyökérmerisztémában. Az NO IES indukált gyökérképződést serkentő hatása függ a sejtek intracelluláris cGMP koncentrációjától, habár feltételezhető egy cGMP független út is (Pagnussat,G. 2002; Pagnussat,G. 2004; Pagnussat,G. 2003). Az auxin által indukált, a gyökérben és levélprotoplaszt eredetű sejtekben mitotikus aktivitást kiváltó, NO függő jelátviteli kaszkád lejjebb ható („downstream”) elemeiről azonban nem áll adat rendelkezésünkre. Mintahogy az sem ismert, hogy az osztódó, embriogén sejtek kialakulásáért és a járulékos gyökérképződésért felelős, nitrogén oxid által befolyásolt jelátviteli utak vajon ugyanazok-e.

Amellett, hogy az L-NMMA és az SNP is befolyásolja az osztódó sejtek számát, auxin koncentráció függő módon hatnak a levélprotoplaszt eredetű sejtek fejlődésére. Ezek a sejtek vagy vakuolizált, elongált sejtekké vagy kis, sűrű citoplazmával rendelkező, izodiametrikus embriogén sejtekké alakulnak át (Bögre,L. 1990; Dudits,D. 1991; Pasternak,T.P. 2002; Fehér, 2002). A fejlődési utak az exogén auxin koncentrációtól vagy az oxidatív stresszt indukáló anyagoktól függnnek (Pasternak,T.P. 2002). Az NO donor SNP kezelés hatására alacsony (1  $\mu$ M) 2,4-D jelenlétében embriogén típusú sejtek jelentek meg a táptalajban, olyanok, amilyenek magas (10  $\mu$ M) 2,4-D hatására képződtek volna. Az *MsSERK1* gén erős kifejeződése és a sejtek további

fejlődése szomatikus embriók kialakulásához vezetett, tehát az NO donor SNP megváltoztatta az auxinnal kezelt sejtek fejlődési útját.

Az *MsSERK1* gén a répa (Schmidt,E.D.L. 1997) és az *Arabidopsis* (Hecht,V. 2001) *SERK* gén lucerna ortológja és a szomatikus valamint a zigotikus embriogenezisben vesz részt. A *SERK* gén expresszióját alapvetően embriogén markernek vélik, habár az auxin indukálta gyökérképződésben is szerepe van (Nolan,K.E. 2003), ezért inkább morfogén, mint embriogén markernek tekinthető.

A NOS inhibitor L-NMMA jelenlétében még magas (10  $\mu$ M) 2,4-D hatására is elongált, vakuolizált sejtek jelenlétét detektáltuk. Az embriogén sejtek kialakulását azonban az L-NMMA nem blokkolta, inkább lassította, amit a *SERK* gén kifejeződése ill. a sejtek további fejlődése is alátámasztott. A késleltetés nagyon hasonló volt, a protoplaszt eredetű sejtek sejtciklusba való belépésekor tapasztaltakkal, ami újjabb bizonyíték az NO auxin jelátviteli utat módosító és jelen esetben embriogén sejtcsoportok kialakulását befolyásoló hatására.

Az első sejtosztódás idejének és az embriogén sejtek kialakulásának összefüggését lucerna levél eredetű sejtek esetében laboratóriumunkban már korábban is megfigyelték a tápközeg pH változásának illetve oxidatív stressz faktorok jelenlétének függvényében (Pasternak,T.P. 2002). Mindezek alapján feltételezhető, hogy egy általános érvényű összefüggésről van szó (Fehér,A. 2005).

## 7. Összefoglalás

„A stressz az élet sava-borsa”- állította Selye János kiváló fiziológusunk. Különösen igaz ez a megállapítás a növények esetében. Mára már egyértelművé vált, hogy a növényi sejtek proliferációját a genetikai háttér mellett extracelluláris hatások, így stresszhatások is nagyban befolyásolják. Reaktív oxigén vegyületek és a nitrogén oxid gátolják vagy elősegítik a sejt proliferációját módosítva a sejt azon jelátviteli útjait, melyek meghatározzák a sejt túlélése, proliferációja és halála közötti döntést.

Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az NO, mint általános stresszor és fejlődés szabályozó molekula, milyen szerepet játszik a sejtosztódás és differenciáció, e két, a növényi szervezet fejlődését döntően meghatározó folyamatban.

Elvégzett kísérleteink tükrében elmondható:

1. Meghatározott koncentrációban NO donorok exogén auxin koncentráció függő módon segítik elő lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklusának reaktivációját.
2. Az NO befolyásolja az auxin jelátviteli utat.
3. NOS inhibitor (L-NMMA) gátolja a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklusának aktivációját, de annak progresszióját nem.
4. A sejtciklus aktivációjának lucerna levéleredetű sejtekben van egy NO szenzitív szakasza, mely valószínűleg NOS aktivitáshoz köthető.
5. NO donorok nem befolyásolják az exponenciálisan osztódó lucerna sejt kultúra sejtciklusának progresszióját, holott azok reagálnak az NO kezelésre (ferritin).
6. Az NO részt vesz a 2,4-D indukált embriogén sejtcsoportok kialakításában.
7. Az NO-nak (auxin függő módon) sejt sors meghatározó szerepe van lucernában.

Munkánk során nyilvánvalóvá vált, hogy az NO auxin függő módon részt vesz a levélszövet dedifferenciációs folyamataiban, úgy hogy megfelelő körülmények között serkenti az embriogén sejt kultúrák kialakulását is. Azonban, ami eredményeinkből látszik az csupán a jéghegy csúcsa. Az általunk felismert jelenségek mögött mélyebb, rejtett összefüggések állnak. Az NO jelátviteli út auxin szignalizációhoz való kapcsolódási pontja(i)nak és az NO közvetlen vagy közvetett a sejtciklust szabályozó gépezetre gyakorolt hatásának megértéséhez további adatok szükségesek. Őszintén reméljük, hogy eredményeink más kutatókat is inspirálni fognak az NO „jéghegy” teljes felderítésére.



## 8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dudits Dénesnek a témaválasztásért és témavezetőmnek Dr. Fehér Attilának a munkám során nyújtott áldozatos segítségéért, a szakmai irányításért, a szakmai konferenciákon való részvétel biztosításának lehetőségéért és legfőképp végtelen türelméért.

Megkülönböztetett köszönet illeti a Funkcionális Sejtbiológia csoport összes dolgozóját, továbbá az Oligoszintézis Labor és a Sejtosztódás és Differenciálódás Csoport tagjait és külön köszönöm Miskolczi Pál, Rigó Gábor, Dr. Bakó László és Dr. Horváth V. Gábor hasznos tanácsait.

Végtelen hálával tartozom férjemnek, családomnak és barátaimnak, hogy tanulmányaim és munkám során végig kitartottak mellettem és gondoskodásukkal, szeretetükkel támogattak, éltettek.

## 9. Referencia Lista

- Ach,R.A., Durfee,T., Miller,A.B., Taranto,P., Hanley-Bowdoin,L., Zambryski,P.C., and Gruissem,W.** (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol.Cell Biol.* **17**:5077-5086.
- Al Sa'doni,H. and Ferro,A.** (2000) S-nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical Science* **98**:507-520.
- Alderton,W.K., Cooper,C.E., and Knowles,R.G.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**:593-615.
- Anantharaman,V. and Aravind,L.** (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**:579-582.
- Anderson,L.S. and Mansfield,T.A.** (1979) Effects of Nitric-Oxide Pollution on the Growth of Tomato. *Environmental Pollution* **20**:113-121.
- Appleby,C.A.** (1984) Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**:443-478.
- Baker,C.J. and Mock,N.M.** (1994) An Improved Method for Monitoring Cell-Death in Cell-Suspension and Leaf Disc Assays Using Evans Blue. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **39**:7-12.
- Barroso,J.B., Corpas,F.J., Carreras,A., Sandalio,L.M., Valderrama,R., Palma,J.M., Lupianez,J.A., and del Rio,L.A.** (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J.Biol.Chem.* **274**:36729-36733.
- Beligni,M.V., Fath,A., Bethke,P.C., Lamattina,L., and Jones,R.L.** (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* **129**:1642-1650.
- Beligni,M.V. and Lamattina,L.** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**:215-221.
- Beligni,M.V. and Lamattina,L.** (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends in Plant Science* **6**:508-509.
- Bethke,P.C., Badger,M.R., and Jones,R.L.** (2004a) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**:332-341.
- Bethke,P.C., Gubler,F., Jacobsen,J.V., and Jones,R.L.** (2004b) Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**:847-855.
- Blume,Y.B., Nyporko,O., and Demchuk,O.** (2005) Nitrotyrosination of plant  $\alpha$ -tubulin: potential mechanisms of influence on cellular processes. *BMC Plant Biology* **5**:S26.
- Bögre,L., Stefanov,I., Ábrahám,M., Somogyi,I., and Dudits,D.** (1990) Differences in the responses to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment between embryogenic and non-embryogenic lines of alfalfa. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, H.J.J.Nijkamp, L.H.W.van der Plaas, and J.Van Aartwijk, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 427-436.
- Bogusz,D., Appleby,C.A., Landsmann,J., Dennis,E.S., Trinick,M.J., and Peacock,W.J.** (1988) Functioning Hemoglobin Genes in Non-Nodulating Plants. *Nature* **331**:178-180.
- Boon,E.M. and Huang,H.S.** (2005) A molecular basis for NO selectivity in soluble guanylate cyclase. *Nature Chemical Biology* **1**:53-59.

- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y., and Mansuy, D.** (1992) Cytochrome P450 Catalyzes the Oxidation of N-Omega-Hydroxy-L-Arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to Nitric-Oxide and Citrulline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **187**:880-886.
- Brandish, P.E., Buechler, W., and Marletta, M.A.** (1998) Regeneration of the ferrous heme of soluble guanylate cyclase from the nitric oxide complex: Acceleration by thiols and oxyhemoglobin. *Biochemistry* **37**:16898-16907.
- Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., Lusi, A.J., Lee, J.J., Lee, N.A., Abu-Soud, H.M., Ischiropoulos, H., and Hazen, S.L.** (2002) A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **277**:17415-17427.
- Buchanan-Wollaston, V.** (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiol* **105**:839-846.
- Capone, R., Tiwari, B.S., and Levine, A.** (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem.* **42**:425-428.
- Carimi, F., Zottini, M., Costa, A., Cattelan, I., De Michele, R., Terzi, M., and Lo Schiavo, F.** (2005) NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell and Environment* **28**:1171-1178.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., and Lo, S.F.** (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**:413-421.
- Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R.** (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **269**:29409-29415.
- Charbonnel-Campaa, L., Lauga, B., and Combes, D.** (2000) Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. *Gene* **254**:199-208.
- Chen, H.J., Hou, W.C., Yang, C.Y., Huang, D.J., Liu, J.S., and Lin, Y.H.** (2003) Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *J. Plant Physiol* **160**:547-555.
- Cherian, M.G. and Apostolova, M.D.** (2000) Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cellular and Molecular Biology* **46**:347-356.
- Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T., and Bok, S.H.** (1996) Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **112**:353-359.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**:667-677.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**:159-182.
- Cooper, C.E.** (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem. Sci.* **27**:33-39.
- Crawford, N.M. and Guo, F.Q.** (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science* **10**:195-200.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S., and Golvano, M.P.** (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters* **398**:159-164.

- Dahl,M., Meskiene,I., Bögre,L., Ha,D.T.C., Swoboda,I., Hubmann,R., Hirt,H., and Heberleborgs,E.** (1995) The D-Type Alfalfa Cyclin Gene Cycms4 Complements G(1) Cyclin-Deficient Yeast and Is Induced in the G(1) Phase of the Cell-Cycle. *Plant Cell* **7**:1847-1857.
- Davies,C. and Robinson,S.P.** (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* **122**:803-812.
- de Jager,S.M., Maughan,S., Dewitte,W., Scofield,S., and Murray,J.A.** (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin.Cell Dev.Biol.* **16**:385-396.
- de Miranda,JR., Thomas,MA., Thurman,DA., and Tomsett,AB.** (1990) Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Lett.* **260**:277-280.
- Deák,M., Horváth,G.V., Davletova,S., Török,K., Sass,L., Vass,I., Barna,B., Király,Z., and Dudits,D.** (1999a) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* **17**:192-196.
- del Pozo,J.C., Lopez-Matas,M.A., Ramirez-Parra,E., and Gutierrez,C.** (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* **123**:173-183.
- Delledonne,M., Xia,Y.J., Dixon,R.A., and Lamb,C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**:585-588.
- Delledonne,M., Zeier,J., Marocco,A., and Lamb,C.** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:13454-13459.
- Desikan,R., Griffiths,R., Hancock,J., and Neill,S.** (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:16314-16318.
- Devignat,R.** (1952) The Griess reaction carried out on non-nitrated broth medium in the study of various pathogenic bacteria. *Ann Inst Pasteur* **82**:653-655.
- Dewitte,W. and Murray,J.A.H.** (2003) The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* **54**:235-264.
- Diaz,M., Achkor,H., Titarenko,E., and Martinez,M.C.** (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *Febs Letters* **543**:136-139.
- Dimmeler,S., Fleming,I., Fisslthaler,B., Hermann,C., Busse,R., and Zeiher,A.M.** (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**:601-605.
- Dordas,C., Hasinoff,B.B., Igamberdiev,A.U., Manac'h,N., Rivoal,J., and Hill,R.D.** (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant Journal* **35**:763-770.
- Draper,J.** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science* **2**:162-165.
- Drapier,J.C. and Hibbs,J.B.** (1996) Aconitases: A class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Nitric Oxide, Pt B* **269**:26-36.
- Dudits,D., Bögre,L., and Györgyey,J.** (1991) Molecular and Cellular Approaches to the Analysis of Plant Embryo Development from Somatic-Cells Invitro. *Journal of Cell Science* **99**:473-&.

- Durner,J., Wendehenne,D., and Klessig,D.F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:10328-10333.
- Ehsan,H., Reichheld,J.P., Roef,L., Witters,E., Lardon,F., Van Bockstaele,D., Van Montagu,M., Inze,D., and Van Onckelen,H.** (1998) Effect of indomethacin on cell cycle dependent cyclic AMP fluxes in tobacco BY-2 cells. *Febs Letters* **422**:165-169.
- Espey,M.G., Miranda,K.M., Thomas,D.D., and Wink,D.A.** (2002) Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells. *Free Radical Biology and Medicine* **33**:827-834.
- Fehér,A.** (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? In *Somatic Embryogenesis*, A.Mujib and J.Samaj, eds (Heidelberg, Germany: Springer).
- Fehér,A., Pasternak,T., Ötvös,K., Miskolczi,P., and Dudits,D.** (2002a) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia* **57**:5-12.
- Feussner,M., Richter,H., Baum,O., and Gossrau,R.** (2001) Association of soluble guanylate cyclase with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers. *Acta Histochemica* **103**:265-277.
- Friebe,A. and Koesling,D.** (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation Research* **93**:96-105.
- Fülöp,K., Pettkó-Szandtner,A., Magyar,Z., Miskolczi,P., Kondorosi,E., Dudits,D., and Bakó,L.** (2005) The Medicago CDKC; 1-CYCLINT; 1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant Journal* **42**:810-820.
- Fulton,D., Gratton,J.P., McCabe,T.J., Fontana,J., Fujio,Y., Walsh,K., Franke,T.F., Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C.** (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt (vol 399, pg 597, 1999). *Nature* **400**:792.
- Gabaldon,C., Gomez Ros,L.V., Pedreno,M.A., and Ros,B.A.** (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.* **165**:121-130.
- Galbraith,D.W., Harkins,K.R., Maddox,J.M., Ayres,N.M., Sharma,D.P., and Firoozabady,E.** (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell-Cycle in Intact Plant-Tissues. *Science* **220**:1049-1051.
- Garces,H., Durzan,D., and Pedroso,M.C.** (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **87**:567-574.
- Garcia-Mata,C., Gay,R., Sokolovski,S., Hills,A., Lamattina,L., and Blatt,M.R.** (2003) Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:11116-11121.
- Garcia-Mata,C. and Lamattina,L.** (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* **128**:790-792.
- Garcia-Mata,C. and Lamattina,L.** (2003) Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science* **8**:20-26.
- Gardner,P.R. and Fridovich,I.** (1991) Superoxide Sensitivity of the Escherichia-Coli Aconitase. *Journal of Biological Chemistry* **266**:19328-19333.
- Gaston,B.** (1999) Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1411**:323-333.
- Gaston,B.M., Carver,J., Doctor,A., and Palmer,L.A.** (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol.Interv.* **3**:253-263.

- Genschik,P., Criqui,M.C., Parmentier,Y., Derevier,A., and Fleck,J.** (1998) Cell cycle -dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* **10**:2063-2076.
- Gilles-Gonzalez,M.A. and Gonzalez,G.** (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**:1-22.
- Gladwin,M.T., Shelhamer,J.H., Schechter,A.N., Pease-Fye,M.E., Waclawiw,M.A., Panza,J.A., Ognibene,F.P., and Cannon,R.O.** (2000) Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:11482-11487.
- Gould,K.S., Lamotte,O., Klinguer,A., Pugin,A., and Wendehenne,D.** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell and Environment* **26**:1851-1862.
- Gouvea,C.M.C.P., Souza,J.F., Magalhaes,A.C.N., and Martins,I.S.** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21**:183-187.
- Gow,A.J., Duran,D., Malcolm,S., and Ischiropoulos,H.** (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *Febs Letters* **385**:63-66.
- Gow,A.J., Farkouh,C.R., Munson,D.A., Posencheg,M.A., and Ischiropoulos,H.** (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **287**:L262-L268.
- Graziano,M., Beligni,M.V., and Lamattina,L.** (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol* **130**:1852-1859.
- Guo,F.Q., Okamoto,M., and Crawford,N.M.** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**:100-103.
- Guo,K., Andres,V., and Walsh,K.** (1998) Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **97**:2066-2072.
- Gupta,K.J., Stoimenova,M., and Kaiser,W.M.** (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* **56**:2601-2609.
- Haendeler,J., Hoffmann,J., Tischler,V., Berk,B.C., Zeiher,A.M., and Dimmeler,S.** (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biology* **4**:743-749.
- Halperin,W.** (1969) Morphogenesis in cell cultures. *Ann Rev Plant Physiol* **20**:395-418.
- Harper, J.E.** (1981) Evolution of nitrogen oxide(s) during *in vivo* nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiology* **68**:1488-1493.
- Harrison,R.** (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine* **33**:774-797.
- Hausladen,A. and Fridovich,I.** (1994) Superoxide and Peroxynitrite Inactivate Aconitases, But Nitric-Oxide Does Not. *Journal of Biological Chemistry* **269**:29405-29408.
- He,Y.K., Tang,R.H., Hao,Y., Stevens,R.D., Cook,C.W., Am,S.M., Jing,L.F., Yang,Z.G., Chen,L.G., Guo,F.Q., Fiorani,F., Jackson,R.B., Crawford,N.M., and Pei,Z.M.** (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**:1968-1971.
- Hecht,V., Vielle-Calzada,J.P., Hartog,M.V., Schmidt,E.D.L., Boutilier,K., Grossniklaus,U., and de Vries,S.C.** (2001) The Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Gene Is Expressed in

Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. *Plant Physiology* **127**:803-816.

**Hetherington, A.M.** (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**:711-714.

**Hogg, N., Singh, R.J., Konorev, E., Joseph, J., and Kalyanaraman, B.** (1997) S-nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemical Journal* **323**:477-481.

**Hoshi, T.** (1995) Regulation of Voltage-Dependence of the Kat1 Channel by Intracellular Factors. *Journal of General Physiology* **105**:309-328.

**Hou, Y.C., Guo, Z.M., Li, J., and Wang, P.G.** (1996) Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **228**:88-93.

**Hu, X.Y., Neill, S.J., Tang, Z.C., and Cai, W.M.** (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* **137**:663-670.

**Huang, J.M., Sommers, E.M., Kim-Shapiro, D.B., and King, S.B.** (2002) Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *Journal of the American Chemical Society* **124**:3473-3480.

**Huang, X., von Rad, U., and Durner, J.** (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**:914-923.

**Hufton, C.A., Besford, R.T., and Wellburn, A.R.** (1996) Effects of NO (+NO<sub>2</sub>) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO<sub>2</sub> enrichment. *New Phytologist* **133**:495-501.

**Hunt, P.W., Watts, R.A., Trevaskis, B., Llewelyn, D.J., Burnell, J., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (2001) Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Molecular Biology* **47**:677-692.

**Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J.H., and Murray, J.A.** (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* **37**:155-169.

**Igamberdiev, A.U., Seregélyes, C., Manac'h, N., and Hill, R.D.** (2004) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* **219**:95-102.

**Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T., and Maeda, H.** (1999) Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**:27069-27075.

**Irie, Y., Saeki, M., Kamisaki, Y., Martin, E., and Murad, F.** (2003) Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:5634-5639.

**Ischiropoulos, H.** (1998) Biological tyrosine nitration: A pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**:1-11.

**Jackson, M.B.** (2002) Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *Journal of Experimental Botany* **53**:175-181.

**Janssen, Y.M., Soultanakis, R., Steece, K., Heerdt, E., Singh, R.J., Joseph, J., and Kalyanaraman, B.** (1998) Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am. J. Physiol.* **275**:L1100-L1109.

- Jayasurya,A., Bay,B.H., Yap,W.M., and Tan,N.G.** (2000) Correlation of metallothionein expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *British Journal of Cancer* **82**:1198-1203.
- Jensen,D.E., Belka,G.K., and Du Bois,G.C.** (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**:659-668.
- Jia,L., Bonaventura,C., Bonaventura,J., and Stamler,J.S.** (1996) S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* **380**:221-226.
- Joubes,J., Chevalier,C., Dudits,D., Heberle-Bors,E., Inze,D., Umeda,M., and Renaudin,J.P.** (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* **43**:607-620.
- Jourd'Heuil,D.** (2002) Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: Implications for the measurement of intracellular nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **33**:676-684.
- Kaiser,W.M., Weiner,H., Kandlbinder,A., Tsai,C.B., Rockel,P., Sonoda,M., and Planchet,E.** (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* **53**:875-882.
- Kamisaki,Y., Wada,K., Bian,K., Balabanli,B., Davis,K., Martin,E., Behbod,F., Lee,Y.C., and Murad,F.** (1998) An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:11584-11589.
- Kao,K.N. and Michayluk,M.R.** (1980) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z Pflanzenphysiol.* **96**:135-141.
- Kapros,T., Bögre,L., Németh,K., Bakó,L., Györgyey,J., Wu,S.C., and Dudits,D.** (1992) Differential Expression of Histone H3 Gene Variants During Cell-Cycle and Somatic Embryogenesis in Alfalfa. *Plant Physiology* **98**:621-625.
- Keeley,J.E. and Fotheringham,C.J.** (1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* **276**:1248-1250.
- Klepper,LA.** (1975) Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* **184**:70.
- Klepper,LA.** (1978) Nitric oxide (NO) evolution from herbicide-treated soybean plants. *Plant Physiology* **61**:65.
- Klepper,LA.** (1987) Nitric oxide emissions from soybean leaves during in vivo nitrate reductase assays. *Plant Physiol* **85**:96-99.
- Klepper,L.** (1991) Nox Evolution by Soybean Leaves Treated with Salicylic-Acid and Selected Derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **39**:43-48.
- Klessig,D.F., Durner,J., Noad,R., Navarre,D.A., Wendehenne,D., Kumar,D., Zhou,J.M., Shah,J., Zhang,S.Q., Kachroo,P., Trifa,Y., Pontier,D., Lam,E., and Silva,H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:8849-+.
- Kojima,H., Nakatsubo,N., Kikuchi,K., Kawahara,S., Kirino,Y., Nagoshi,H., Hirata,Y., and Nagano,T.** (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal.Chem.* **70**:2446-2453.
- Kopperud,R., Krakstad,C., Selheim,F., and Doskeland,S.O.** (2003) cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *Febs Letters* **546**:121-126.
- Kozlov,A.V., Staniek,K., and Nohl,H.** (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *Febs Letters* **454**:127-130.



**Kroncke,K.D.** (2001) Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid.Redox Signal.* **3**:565-575.

**Kroncke,K.D.** (2003) Nitrosative stress and transcription. *Biol.Chem.* **384**:1365-1377.

**Kroncke,K.D. and Carlberg,C.** (2000) Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *Faseb Journal* **14**:166-173.

**Kroncke,K.D., Fehsel,K., Schmidt,T., Zenke,F.T., Dasting,I., Wesener,J.R., Bettermann,H., Breunig,K.D., and Kolb-Bachofen,V.** (1994) Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **200**:1105-1110.

**Kumar,D. and Klessig,D.F.** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13**:347-351.

**Kundu,S., Trent,J.T., and Hargrove,M.S.** (2003) Plants, humans and hemoglobins. *Trends in Plant Science* **8**:387-393.

**Kuo,R.K., Baxter,G.T., Thompson,S.H., Stricker,S.A., Patton,C., Bonaventura,J., and Epel,D.** (2000) NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* **406**:633-636.

**Lakshminarayan,M., Anantharaman,V., and Aravind,L.** (2003) Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* **4**.

**Lamattina, L., Beligni, M. V., Garcia-Mata, C., and Laxalt, AM.** Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. [US Patent. US 6242384 B1.]. 2001.  
Ref Type: Patent

**Lamattina,L., Garcia-Mata,C., Graziano,M., and Pagnussat,G.** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu.Rev.Plant Biol.* **54**:109-136.

**Lamotte,O., Courtois,C., Barnavon,L., Pugin,A., and Wendehenne,D.** (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**:1-4.

**Lamotte,O., Gould,K., Lecourieux,D., Sequeira-LeGrand,A., Lebrun-Garcia,A., Durner,J., Pugin,A., and Wendehenne,D.** (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**:516-529.

**Lander,H.M., Hajjar,D.P., Hempstead,B.L., Mirza,U.A., Chait,B.T., Campbell,S., and Quilliam,L.A.** (1997) A molecular redox switch on p21(ras) - Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *Journal of Biological Chemistry* **272**:4323-4326.

**Lander,H.M., Ogiste,J.S., Pearce,S.F.A., Levi,R., and Novogrodsky,A.** (1995) Nitric Oxide-Stimulated Guanine-Nucleotide Exchange on P21(Ras). *Journal of Biological Chemistry* **270**:7017-7020.

**Lawson,D.M., Stevenson,C.E.M., Andrew,C.R., and Eady,R.R.** (2000) Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *Embo Journal* **19**:5661-5671.

**Leshem Y.** (2001) *Nitric oxide in plants*. London, UK: Kluwer Academic Publishers.

**Leshem,Y.Y. and Haramaty,E.** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**:258-263.

**Leshem,Y.Y., Haramaty,E., Iluz,D., Malik,Z., Sofer,Y., Roitman,L., and Leshem,Y.** (1997) Effect of stress nitric oxide (NO): Interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**:573-579.

- Leshem, Y.Y. and Pinchasov, Y.** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J.Exp.Bot.* **51**:1471-1473.
- Lillo, C., Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., and Oltegal, S.** (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* **55**:1275-1282.
- Lin, L.H. and Talman, W.T.** (2005) Soluble guanylate cyclase and neuronal nitric oxide synthase colocalize in rat nucleus tractus solitarius. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **29**:127-136.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., and Durner, J.** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**:921-930.
- Liu, L.M., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., and Stamler, J.S.** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**:490-494.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., and Waldman, S.A.** (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews* **52**:375-413.
- Ludidi, N. and Gehring, C.** (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:6490-6494.
- Mackerness, S.A.H., John, C.F., Jordan, B., and Thomas, B.** (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *Febs Letters* **489**:237-242.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., and Thompson, J.A.** (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:11853-11858.
- Maejima, Y., Adachi, S., Ito, H., Nobori, K., Tamamori-Adachi, M., and Isobe, M.** (2003) Nitric oxide inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by modulating cyclin A-associated kinase activity. *Cardiovascular Research* **59**:308-320.
- Magalhaes, JR, Monte, DC, and Durzan D.** (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **6**:117-127.
- Magyar, Z., Bakó, L., Bögre, L., Dedeoglu, D., Kapros, T., and Dudits, D.** (1993) Active Cdc2-Genes and Cell-Cycle Phase-Specific Cdc2-Related Kinase Complexes in Hormone-Stimulated Alfalfa Cells. *Plant Journal* **4**:151-161.
- Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Koncz, C., and Dudits, D.** (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**:223-235.
- Mannick, J.B., Hausladen, A., Liu, L.M., Hess, D.T., Zeng, M., Miao, Q.X., Kane, L.S., Gow, A.J., and Stamler, J.S.** (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**:651-654.
- Mansuy, D. and Boucher, J.L.** (2002) Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metabolism Reviews* **34**:593-606.
- Marti, M.A., Capece, L., Crespo, A., Doctorovich, F., and Estrin, D.A.** (2005) Nitric oxide interaction with cytochrome c' and its relevance to guanylate cyclase. Why does the iron histidine bond break? *Journal of the American Chemical Society* **127**:7721-7728.
- Mata, C.G. and Lamattina, L.** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**:1196-1204.

- Mcaninly,J., Williams,D.L.H., Askew,S.C., Butler,A.R., and Russell,C.** (1993) Metal-Ion Catalysis in Nitrosothiol (R<sub>sno</sub>) Decomposition. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*:1758-1759.
- Mccabe,T.J., Fulton,D., Roman,L.J., and Sessa,W.C.** (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **275**:6123-6128.
- Mcintosh,L.** (1994) Molecular-Biology of the Alternative Oxidase. *Plant Physiology* **105**:781-786.
- Meijer,M. and Murray,J.A.H.** (2000) The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol.Biol.* **43**:621-633.
- Meskiene,I., Bögre,L., Dahl,M., Pirck,M., Ha,D.T.C., Swoboda,I., Heberleborgs,E., Ammerer,G., and Hirt,H.** (1995) Cycms3, A Novel B-Type Alfalfa Cyclin Gene, Is Induced in the G(0)-To-G(1) Transition of the Cell-Cycle. *Plant Cell* **7**:759-771.
- Mészáros,T., Miskolczi,P., Ayaydin,F., Pettkó-Szandtner,A., Peres,A., Magyar,Z., Horváth,G.V., Bakó,L., Fehér,A., and Dudits,D.** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G(2)/M progression in alfalfa cells. *Plant Molecular Biology* **43**:595-605.
- Millar,A.H. and Day,D.A.** (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *Febs Letters* **398**:155-158.
- Millar,A.H. and Day,D.A.** (1997) Alternative solutions to radical problems. *Trends in Plant Science* **2**:289-290.
- Millar,T.M., Stevens,C.R., Benjamin,N., Eisenthal,R., Harrison,R., and Blake,D.R.** (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *Febs Letters* **427**:225-228.
- Miller,J.D., Arteca,R.N., and Pell,E.J.** (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **120**:1015-1024.
- Mir,G., Domenech,J., Huguet,G., Guo,W.J., Goldsbrough,P., Atrian,S., and Molinas,M.** (2004) A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **55**:2483-2493.
- Mizuno,S., Kadowaki,M., Demura,Y., Ameshima,S., Miyamori,I., and Ishizaki,T.** (2004) p42/44 mitogen-activated protein kinase regulated by p53 and nitric oxide in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **31**:184-192.
- Modolo,L.V., Cunha,F.Q., Braga,M.R., and Salgado,I.** (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* **130**:1288-1297.
- Mohr,S., McCormick,T.S., and Lapetina,E.G.** (1998) Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD 098059. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:5045-5050.
- Morgan,D.O.** (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**:261-291.
- Morot-Gaudry-Talarmain,Y., Rockel,P., Moureaux,T., Quillere,I., Leydecker,M.T., Kaiser,W.M., and Morot-Gaudry,J.F.** (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215**:708-715.

- Moutinho,A., Hussey,P.J., Trewavas,A.J., and Malho,R.** (2001) cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:10481-10486.
- Murashige,T. and Skoog,F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473-497.
- Murgia,I., Delledonne,M., and Soave,C.** (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. *Plant Journal* **30**:521-528.
- Nagel,W.W. and Vallee,B.L.** (1995) Cell-Cycle Regulation of Metallothionein in Human Colonic-Cancer Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:579-583.
- Naseem,K.M., Low,S.Y., Sabetkar,M., Bradley,N.J., Khan,J., Jacobs,M., and Bruckdorfer,K.R.** (2000) The nitration of platelet cytosolic proteins during agonist-induced activation of platelets. *FEBS Lett.* **473**:119-122.
- Navarre,D.A., Wendehenne,D., Durner,J., Noad,R., and Klessig,D.F.** (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology* **122**:573-582.
- Neill,S.J., Desikan,R., Clarke,A., and Hancock,J.T.** (2002a) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* **128**:13-16.
- Neill,S.J., Desikan,R., Clarke,A., Hurst,R.D., and Hancock,J.T.** (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**:1237-1247.
- Neill,S.J., Desikan,R., and Hancock,J.T.** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159**:11-35.
- Newton,R.P., Roef,L., Witters,E., and Van Onckelen,H.** (1999) Tansley Review No. 106 - Cyclic nucleotides in higher plants: the enduring paradox. *New Phytologist* **143**:427-455.
- Nikitovic,D. and Holmgren,A.** (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **271**:19180-19185.
- Ninnemann,H. and Maier,J.** (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology* **64**:393-398.
- Nishimura,H.** (1986) Reduction of NO<sub>2</sub> to NO by rush and other plants. *Environ.Sci.Technol.* **20**:413-416.
- Nolan,K.E., Irwanto,R.R., and Rose,R.J.** (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology* **133**:218-230.
- Noritake,T., Kawakita,K., and Doke,N.** (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology* **37**:113-116.
- Packer,L.** (1995) The Detection of Nitric Oxide in Biological Systems. *Methods in Enzymology* **7**:21-108.
- Pagnussat,G.C., Lanteri,M.L., and Lamattina,L.** (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* **132**:1241-1248.
- Pagnussat,G.C., Lanteri,M.L., Lombardo,M.C., and Lamattina,L.** (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* **135**:279-286.

- Pagnussat,G.C., Simontacchi,M., Puntarulo,S., and Lamattina,L.** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* **129**:954-956.
- Pasternak,T., Miskolczi,P., Ayaydin,F., Mészáros,T., Dudits,D., and Fehér,A.** (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation* **32**:129-141.
- Pasternak,T.P., Prinsen,E., Ayaydin,F., Miskolczi,P., Potters,G., Asard,H., Van Onckelen,H.A., Dudits,D., and Fehér,A.** (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* **129**:1807-1819.
- Patterson,S.** (2002) Posttranslational protein S-palmitoylation and the compartmentalization of signaling molecules in neurons. *Biol.Res.* **35**:139-150.
- Pedroso,M.C., Magalhaes,J.R., and Durzan,D.** (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany* **51**:1027-1036.
- Perazzolli,M., Dominici,P., Romero-Puertas,M.C., Zago,E., Zeier,A., Sonoda,M., Lamb,C., and Delledonne,M.** (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**:2785-2794.
- Pervin,S., Singh,R., and Chaudhuri,G.** (2001) Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:3583-3588.
- Peunova,N. and Enikolopov,G.** (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* **375**:68-73.
- Peunova,N., Kuzin,B., Roberts,I., O'Kane,C., and Enikolopov,G.** (1996) Nitric oxide, cell multiplication, and cell survival. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **61**:417-426.
- Peunova,N., Scheinker,V., Cline,H., and Enikolopov,G.** (2001) Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *J.Neurosci.* **21**:8809-8818.
- Planchet,E., Gupta,K.J., Sonoda,M., and Kaiser,W.M.** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal* **41**:732-743.
- Prado,A.M., Porterfield,D.M., and Feijo,J.A.** (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**:2707-2714.
- Radi,R.** (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:4003-4008.
- Ramirez-Parra,E., Desvoyes,B., and Gutierrez,C.** (2005) Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int.J.Dev.Biol.* **49**:467-477.
- Rao,M.V. and Davis,K.R.** (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**:682-690.
- Raven,J.A.** (2003) Can plants rely on nitrate? *Trends in Plant Science* **8**:314-315.
- Reyes-Harde,M., Potter,B.V.L., Galione,A., and Stanton,P.K.** (1999) Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca<sup>2+</sup> release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *Journal of Neurophysiology* **82**:1569-1576.
- Ribeiro,E.A., Cunha,F.Q., Tamashiro,W.M.S.C., and Martins,I.S.** (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *Febs Letters* **445**:283-286.

- Rockel,P., Strube,F., Rockel,A., Wildt,J., and Kaiser,W.M.** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**:103-110.
- Sakamoto,A., Sakurao,S., Fukunaga,K., Matsubara,T., Ueda-Hashimoto,M., Tsukamoto,S., Takahashi,M., and Morikawa,H.** (2004) Three distinct Arabidopsis hemoglobins exhibit peroxidase-like activity and differentially mediate nitrite-dependent protein nitration. *Febs Letters* **572**:27-32.
- Sato,M. and Bremner,I.** (1993) Oxygen Free-Radicals and Metallothionein. *Free Radical Biology and Medicine* **14**:325-337.
- Sauzeau,V., Rolli-Derkinderen,M., Marionneau,C., Loirand,G., and Pacaud,P.** (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:9472-9480.
- Scherer,G.F.E. and Holk,A.** (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation* **32**:345-350.
- Schmidt,E.D.L., Guzzo,F., Toonen,M.A.J., and deVries,S.C.** (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**:2049-2062.
- Schmidt,P., Youhnovski,N., Daiber,A., Balan,A., Arsic,M., Bachschmid,M., Przybylski,M., and Ullrich,V.** (2003) Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J.Biol.Chem.* **278**:12813-12819.
- Schroeder,J.I., Allen,G.J., Hugouvieux,V., Kwak,J.M., and Waner,D.** (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**:627-658.
- Seregélyes,C., Barna,B., Hennig,J., Konopka,D., Pasternak,T.P., Lukács,N., Fehér,A., Horváth,G.V., and Dudits,D.** (2003) Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. *Plant Science* **165**:541-550.
- Seregélyes,C., Igamberdiev,A.U., Maassen,A., Hennig,J., Dudits,D., and Hill,R.D.** (2004) NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb 1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *Febs Letters* **571**:61-66.
- Seregélyes,C., Mustárdy,L., Ayaydin,F., Sass,L., Kovács,L., Endre,G., Lukács,N., Kovács,I., Vass,I., Kiss,G.B., Horváth,G.V., and Dudits,D.** (2000) Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. *Febs Letters* **482**:125-130.
- Sessa,W.C.** (2004) eNOS at a glance. *Journal of Cell Science* **117**:2427-2429.
- Shao,C., Furusawa,Y., and Aoki,M.** (2003) Sper/NO-induced reversible proliferation inhibition and cycle arrests associated with a micronucleus induction in HSG cells. *Nitric Oxide* **8**:83-88.
- Sheen,J.** (2001) Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* **127**:1466-1475.
- Sies,H., Sharov,V.S., Klotz,L.O., and Briviba,K.** (1997) Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations - A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry* **272**:27812-27817.
- Simontacchi,M., Jasid,S., and Puntarulo,S.** (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* **167**:839-847.
- Sokolovski,S. and Blatt,M.R.** (2004) Nitric oxide block of outward-rectifying K<sup>+</sup> channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol* **136**:4275-4284.
- Song,F.M. and Goodman,R.M.** (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:1458-1462.

- Souza,J.M., Daikhin,E., Yudkoff,M., Raman,C.S., and Ischiropoulos,H.** (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch.Biochem.Biophys.* **371**:169-178.
- Stals,H. and Inze,D.** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* **6**:359-364.
- Stamler,J.S., Lamas,S., and Fang,F.C.** (2001) Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**:675-683.
- Stamler,J.S., Toone,E.J., Lipton,S.A., and Sucher,N.J.** (1997) (S)NO signals: Translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**:691-696.
- Stohr,C., Strube,F., Marx,G., Ullrich,W.R., and Rockel,P.** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**:835-841.
- Takagi,K., Isobe,Y., Yasukawa,K., Okouchi,E., and Suketa,Y.** (1994) Nitric oxide blocks the cell cycle of mouse macrophage-like cells in the early G2+M phase. *FEBS Lett.* **340**:159-162.
- Takahashi,S. and Yamasaki,H.** (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *Febs Letters* **512**:145-148.
- Taylor,E.R., Nie,X.Z., Macgregor,A.W., and Hill,R.D.** (1994) A Cereal Hemoglobin Gene Is Expressed in Seed and Root Tissues Under Anaerobic Conditions. *Plant Molecular Biology* **24**:853-862.
- Thomas,J.C., Perron,M., Larosa,P.C., and Smigocki,A.C.** (2005) Cytokinin and the regulation of a tobacco metallothionein-like gene during copper stress. *Physiologia Plantarum* **123**:262-271.
- Tischner,R., Planchet,E., and Kaiser,W.M.** (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *Febs Letters* **576**:151-155.
- Treisman,R.** (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology* **8**:205-215.
- Trujillo,M., Alvarez,M.N., Peluffo,G., Freeman,B.A., and Radi,R.** (1998) Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry* **273**:7828-7834.
- Tun,N.N., Holk,A., and Scherer,G.F.** (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.* **509**:174-176.
- Van Camp,W., Van Montagu,M., and Inze,D.** (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* **3**:330-334.
- Van,d., V, Eiserich,J.P., Halliwell,B., and Cross,C.E.** (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J.Biol.Chem.* **272**:7617-7625.
- Vandepoele,K., Raes,J., De Veylder,L., Rouze,P., Rombauts,S., and Inze,D.** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:903-916.
- Vanlerberghe,G.C. and McIntosh,L.** (1997) Alternative oxidase: From gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**:703-734.
- Vanneste,S., Maes,L., De Smet,I., Himanen,K., Naudts,M., Inze,D., and Beeckman,T.** (2005) Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* **123**:139-146.
- Wildt,J., Kley,D., Rockel,A., Rockel,P., and Segschneider,H.J.** (1997) Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **102**:5919-5927.
- Willmott,N., Sethi,J.K., Walseth,T.F., Lee,H.C., White,A.M., and Galione,A.** (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**:3699-3705.

- Wink,D.A. and Mitchell,J.B.** (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **25**:434-456.
- Witteck,A., Yao,Y., Fehrer,M., Forstermann,U., and Kleinert,H.** (2003) Rho protein-mediated changes in the structure of the actin cytoskeleton regulate human inducible NO synthase gene expression. *Experimental Cell Research* **287**:106-115.
- Wu,W., Chen,Y., and Hazen,S.L.** (1999) Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J.Biol.Chem.* **274**:25933-25944.
- Xu,L., Eu,J.P., Meissner,G., and Stamler,J.S.** (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* **279**:234-237.
- Yamaguchi,M., Fabian,T., Sauter,M., Bhalerao,R.P., Schrader,J., Sandberg,G., Umeda,M., and Uchimiya,H.** (2000) Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.* **24**:11-20.
- Yamasaki,H.** (2000a) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**:1477-1488.
- Yamasaki,H. and Sakihama,Y.** (2000b) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Febs Letters* **468**:89-92.
- Yoshikawa,S., Shinzawa-Itoh,K., and Tsukihara,T.** (2000) X-ray structure and the reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *J.Inorg.Biochem.* **82**:1-7.
- Yu,L.H., Umeda,M., Liu,J.Y., Zhao,N.M., and Uchimiya,H.** (1998) A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene* **206**:29-35.
- Zemojtel,T., Penzkofer,T., Dandekar,T., and Schultz,J.** (2004) A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends in Biochemical Sciences* **29**:224-226.
- Zhang,H., Shen,W.B., Zhang,W., and Xu,L.L.** (2005) A rapid response of beta-amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta* **220**:708-716.
- Zhang,X., Kim,W.S., Hatcher,N., Potgieter,K., Moroz,L.L., Gillette,R., and Sweedler,J.V.** (2002) Interfering with nitric oxide measurements - 4,5-Diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry* **277**:48472-48478.
- Zhao,Z.G., Chen,G.C., and Zhang,C.L.** (2001) Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**:1055-1061.
- Zottini,M., Formentin,E., Scattolin,M., Carimi,F., Lo Schiavo,F., and Terzi,M.** (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *Febs Letters* **515**:75-78.



## **10. Ph.D. thesis**

### **Background**

During the last few years it became evidence that nitric oxide serves as a signaling molecule in plants such as in animals (Lamattina et. al. 2003). The role of NO in orchestrating plant defense against biotic and abiotic stresses is probably the best established (Delledonne et. al. 1998; Gould et. al. 2003; Neill et. al. 2003). However, there are accumulating pieces of experimental evidence that NO is also involved in the regulation of plant growth and development (for reviews, Lamattina et. al. 2003; Neill et. al. 2003). Among others, NO can stimulate overall plant growth (reviewed by Neill et. al. 2003), root (Gouvea et. al. 1997), hypocotyl (Beligni and Lamattina 2000) and mesocotyl (Zhang et. al. 2003) elongation and induce adventitious root development in various plant species (Pagnussat et. al. 2002, 2003; Correa-Aragunde et. al. 2004). These observations indicate that NO may, directly or indirectly, affect cell elongation and division, the two basic processes of plant morphogenesis. There are no reports, however, about the involvement of NO in the activation and/or the progression of the cell division cycle in cultured plant cells.

### **Aim of our study**

Our main goal was to establish the role of nitric oxide in the regulation of cell division and in the activation of somatic embryogenesis.

As experimental approach we used the unicellular system of alfalfa leaf protoplasts and a continuously dividing cell culture from the same genotype.

During our experiments the concentration of NO in the culture media was changed by exogenous application of NO donors, NO scavenger and an inhibitor of NOS.

## Results and discussion

### **NO is required for and promotes the activation but not the progression of the cell division cycle in plants.**

Individual cell-wall-less plant cells, the protoplasts, isolated from leaf tissues and cultured in synthetic liquid media are probably one of the best *in vitro* experimental models to study the activation of cell division in differentiated plant cells. Although they are isolated via stressful procedure, experimental evidences demonstrate that properly handled protoplasts quickly recover in culture and respond to hormonal as well as stress signals as do intact plant cells (see e.g. Pasternak et. al. 2002; for reviews Sheen 2001, Fehér et. al. 2005).

As the NOS-inhibitor (L-NMMA), as well as the NO scavenger (PTIO) decreased and the NO-donor (SNP) could increase S-phase frequency as well as the division rate of alfalfa leaf protoplast-derived cells, it is very likely that NO is involved in the signaling cascade that leads to the dedifferentiation and division of leaf cells. That the observed effects indeed depend on NO, is strengthened by the observation that the L-NMMA-mediated inhibition of BrdU incorporation as well as the activity of the Medsa;CDKA1,2 kinase could be reverted by SNP application. SNP had a concentration dependent effect on the frequency of protoplast-derived cells entering the S-phase of the cell cycle. 1 and 10  $\mu\text{M}$  SNP promoted while 100  $\mu\text{M}$  inhibited DNA replication. Concentration dependent action of NO is well known in both plant and animal cells. Activation of sea urchin egg cells by NO-donors is possible only in a narrow concentration range and higher concentrations are even inhibitory of sperm cell mediated activation (Kuo et. al. 2000). High level of NO has been reported to inhibit whereas low levels to enhance leaf expansion and plant growth (Neill et. al. 2003; Lamattina et. al. 2003; Beligni and Lamattina 2001, Seregélyes et. al. 2003).

During the process of dedifferentiation, the loss of differentiated functions, recovery from isolation stress, cell wall synthesis and activation of the cell cycle machinery take place in a serial, although overlapping, manner in the protoplast-derived cells (for reviews Fehér et. al. 2003, 2005). It is not clear at what step NO may accelerate the process. Shifted pulses of L-NMMA application and subsequent measurements on BrdU incorporation and CDK activity indicated, however, that protoplast-derived cells older than three days are not responsive for the presence of the NOS inhibitor. It may indicate that an L-NMMA-sensitive step operates during the first three days of the alfalfa leaf protoplast culture and this step likely precedes the entry of the cells into the S-phase of the cell cycle.

In order to address this question, the expression of cyclin genes previously reported to be activated before the S-phase entry (Dahl et. al. 1995) or even at the G0-to-G1 transition of cells (Meskiene et. al. 1995), have been tested in the presence of SNP and L-NMMA. The protein level of a further D-type cyclin, the strongest interactor of the Medsa;CDK;A1,2 kinase in the yeast two-hybrid system (Mészáros et. al. 2000), has also been determined.

Based on the results, specific inhibition of cyclin transcription or accumulation by L-NMMA could not be established. The increased level of both cyclins in response to L-NMMA at 48 hours might indicate that the treated cells had already entered into the division cycle. Interestingly, protoplast-derived cells cultured in the presence of L-NMMA also exhibited increased CDK activity and *SERK* gene expression at around the third days of culture. It is interesting to note that peaks of endogenous indoleacetic acid level and S-phase frequency could be detected at the second and third days of culture, respectively, and embryogenic competence is also established during this period in these protoplast-derived cells (see Pasternak et. al. 2000, 2002, for review Fehér et. al.

2005). It might be speculated that L-NMMA does not block but slows down cell activation that results in the synchronous accumulation of the cells in the G1/S-phases. The synchrony seems to be lost after the S-phase as the cells at this stage become insensitive to the presence of L-NMMA. This may result in a transiently higher transcript/protein/activity levels of the investigated genes/proteins during a certain period. Similar response could be seen in the same type of cultures when cell activation was slowed down by the buffering of the medium pH (Pasternak et. al. 2002, Pasternak T. P. and Fehér A. unpublished results).

To validate the above hypotheses as well as the determination of the exact timing and the nature of the L-NMMA-sensitive process(es) during the dedifferentiation and division of leaf cells require further experimentation.

In agreement with the above findings described for leaf protoplast-derived cells, L-NMMA did not inhibit cell cycle progression or growth rate of continuously dividing suspension-cultured cells, but delayed re-entry of these cells to the cell division cycle after phosphate starvation or after the subculture of eleven-days-old stationary phase cells. SNP at 10-100  $\mu$ M concentrations had no effect on the cell cycle progression of suspension cultured alfalfa cells, although these cells could respond to NO as indicated by 100  $\mu$ M SNP-induced and PTIO-sensitive ferritin protein accumulation (Murgia et. al. 2002). This observation indicates that the absence of the cell cycle response was not due to a general insensitivity of suspension cultured cells towards NO. Although no response to SNP could be observed on phosphate starved or stationary phase cells, it may only be the consequence of the applied experimental conditions (e.g. very rapid re-entry of phosphate starved cells to the cell cycle) that did not allow a proper resolution of cell cycle events.

In contrast to the above observations with plant cells, in the case of animals NO is a well known cytostatic agent and a regulator of the balance between cell proliferation and cell differentiation during animal development (Peunova et. al. 1996; Kuzin et. al. 2000). However, the site where the cell cycle is actually stopped in response to NO varies in different cell types (Pervin et. al. 2001, Guo et. al. 1998; Ishida et. al. 1997, Peunova et. al. 1996, Takagi et. al. 1994). Our experiments revealed that SNP-generated NO did not block cell cycle progression in cultured alfalfa cells. It can not be excluded, however, that NO is involved in the regulation of cell division and differentiation in whole plants or organs.

The observations that neither dividing leaf protoplasts nor dividing suspension cultured cells are responsive to L-NMMA support a hypothesis that the activity of L-NMMA-sensitive plant enzymes is not required to sustain cell division activity in plant cells.

**NO is involved in 2,4-D-induced embryogenic cell formation from alfalfa leaf protoplasts.**

The presented data indicate that although nitric oxide is not required for and does not influence cell cycle progression in exponentially dividing cultured plant cells, it may interplay with auxins linking the regulation of cell division to differentiation. Plants exhibit a remarkable developmental plasticity as compared to animals. Somatic plant cells can regain cell division capability during a process termed as „de-differentiation” and „de-differentiated” plant cells can „re-differentiate” into whole plants under suitable conditions. Our experiments with embryogenic leaf protoplast-derived cells support the view that NO in concert with auxin can play important roles during these transitions.

The altered response of protoplast-derived cells to exogenous auxin concentration in the presence of L-NMMA or SNP, and the observation that in the absence of auxin SNP

could not promote the division of protoplast-derived cells, may indicate that NO alters auxin sensitivity of the cells and/or is involved in the mediation of auxin action during these processes. Auxin and NO have also been suggested to share common steps in signal transduction pathways leading to root elongation (Gouvea et. al. 1997) and adventitious root formation (Pagnussat et. al. 2002; 2003; 2004). In cucumber explants, indoleacetic acid (IAA) treatment induced the level of endogenous NO in the region where the new root meristems developed. The effect of NO on IAA-induced root formation was shown to be dependent on intracellular cGMP levels, although cGMP-independent pathways may also exist (Pagnussat et. al. 2003; 2004). The downstream events of the putative NO-dependent signaling cascade leading to mitotic activation by auxin are unknown. Whether the same NO-affected signal transduction pathways operate during the formation of dividing, embryogenic cells from leaf protoplasts and adventitious root meristem formation remains also a question to be answered.

In addition to the frequency of dividing cells, both L-NMMA and SNP affected the pathway of auxin concentration-dependent development of leaf protoplast-derived cells. It has been previously shown that these cells can develop either to vacuolized, elongated cells or to small, isodiametric cells with dense cytoplasm exhibiting embryogenic competence (Bögre et. al. 1989, Pasternak et. al. 2002, for reviews Dudits et. al. 1991, Fehér et. al. 2003, 2005). These developmental pathways are dependent on exogenous auxin (2,4-D) concentration or oxidative stress-inducing agents (Pasternak et. al. 2002). The application of the nitric oxide donor, SNP, resulted in the formation of embryogenic-type cells at a low (1  $\mu$ M) 2,4-D concentration although these type of cells otherwise appear at higher auxin concentrations (5-10  $\mu$ M 2,4-D). The high level expression of the *MsSERK1* gene (Nolan et. al. 2003) and the further development of

the cells under culture conditions allowing somatic embryo formation verified that SNP application could indeed alter the developmental pathway of the auxin treated cells.

The *MsSERK1* gene is the alfalfa ortholog of the carrot (Schmidt et. al. 1997) and *Arabidopsis* (Hecht et. al. 2001) *SERK* genes implicated both in somatic and zygotic embryogenesis. *SERK* gene expression is frequently used as a marker of embryogenic competence (for review Fehér et. al. 2003) although its elevated expression was also associated with auxin-induced root formation (Nolan et. al. 2003) and was suggested to be rather a morphogenic than only an embryogenic marker.

The application of the NOS inhibitor L-NMMA, resulted in the vacuolization and elongation of the cells at the high (10  $\mu$ M) 2,4-D level in the medium. Embryogenic cell formation, however, was not stopped, only delayed in the presence of L-NMMA as indicated by *SERK* gene expression and further development of the cells. This delay was very similar to the delay observed in the case of the entry of the protoplast-derived cells into the cell division cycle. It is interesting to note, that delayed cell division activity of the same type of cells by transiently altering the medium pH, also resulted in a parallel inhibition of embryogenic cell formation (Pasternak et. al. 2002).

It is well established that 2,4-D induced acquisition of embryogenic competence is associated with endogenous IAA accumulation in various types of plant cells including alfalfa leaf protoplasts (for review Fehér et. al. 2003). Whether auxin (in this case 2,4-D) treatment is also associated with an increase in endogenous NO level, similarly as was observed during root meristem formation (Pagnussat et. al. 2002, 2003), remains an interesting question to be answered.

## 11. Publikációs lista

### A dolgozat alapját képező publikációk:

Fehér, A., Pasternak, T., **Ötvös, K.**, Miskolczi, P. & Dudits, D.: (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*, Bratislava, 57/1:5  
**IF: 0,208**

**Ötvös, K.**: (2003) Learning to say NO.... *Acta Biologica Szegediensis*, 47:49

Fehér, A., Pasternak, T.P., **Ötvös, K.** and Dudits, D.: (2005) Plant protoplasts: Consequences of lost cell walls In: *Journal of a Single Cell to a Plant*. Eds: Murch, S. Saxena PK, Science Publishers Inc., Enfield NH USA,

Fehér, A. And **Ötvös K.**: (2005-6) The physiology of somatic embryo induction: A stressful start: a review In: *Advances in Plant Physiology*. Ed: Hemantaranjan, A. Scientific Publishers, Jodhpur, India, In press.

**Ötvös, K.**, Pasternak, T., Miskolczi, P., Szűcs, A., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide in plants: the cell fate regulator. *NATO Monographs*. In press.

**Ötvös, K.**, Pasternak, T., Miskolczi, P., Szűcs, A., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide in plants: the cell fate regulator. On-line: <http://www.biomedcentral.com/meetings> (abstract service)

**Ötvös, K.**, Pasternak, T., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szűcs A., Bottka, S., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide is involved in the activation of cell division and somatic embryo formation in alfalfa. *The Plant Journal*.43, 849-860.  
**IF: 6.367**

### Egyéb publikációk:

Dorjgotov, D., Szűcs, A., **Ötvös, K.**, Szakonyi, D., Kelemen, Zs., Lendvai, Á.,...,Dudits D, Fehér A: (2003) Specific features of RHO GTPase-dependent signalling in plants. *Cell Biology International*, 27, 191-192  
**IF: 1,092**

Szűcs, A., Dorjgotov, D., **Ötvös, K.**, Fodor, Cs., Domoki, M., Györgyey, J., Kaló, P., Kiss, G.B., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *BBA – Gene Structure and expressio* (közlés alatt)



## 12. Függelék

### A nitrogén oxid jelátviteli folyamatai

A jelátviteli folyamatok lényege, hogy az érzékelt jelre az azt fogadó sejt megfelelő választ adjon. Legfontosabb lépései: recepció/percepció, transzdukció, indukció. Az adott jel receptorához való kötődése (percepció), olyan kémiai és transzport lépéseket aktivál, melyek másodlagos hírvivőn keresztül (transzdukció) kiváltják a megfelelő választ (indukció). Az NO jelátviteli folyamatának komponensei: **jelmolekula/ligand** (maga az NO), **receptorok** (pl. guanilát cikláz), **másodlagos hírvivők** (pl. cGMP) és azok által aktivált további „**downstream**” **elemek** (pl. protein kinázok). A nitrogén oxid jelátviteli folyamatai alapvetően két csoportra oszthatók; cGMP függő és cGMP-független utakra.

### A nitrogén oxid receptorai

Egy receptornak, mint egy effektív szenzornak:

- meghatározott koncentráció tartományban kell kötnie szignálját,
- a szignál kötése meg kell, hogy változtassa aktivitását; aktív állapotból inaktív állapotba vagy fordítva,
- meg kell különböztetnie a fals szignált a fiziológiailag relevánstól,
- a szignál kötődésekor konformáció változáson kell átesnie.

Az NO-nak, mint gáz halmazállapotú anyagnak speciális receptorra (szenzorra) van szüksége. A biológiai hem alapú szenzor fehérjék („hem-based-sensor proteins”) kulcs regulátorai a fluktuáló NO szintre adott adaptív válasznak. A hem alapú szenzor fehérjék egy hem-kötő szabályozó doménnel és egy ehhez kapcsolódó szomszédos jeltovábbító régióval rendelkeznek (Gilles-Gonzalez, 2005). Mára már négy nagy

családjuk és kb. 50 tagjuk ismert. A hem alapú szenzor fehérjék négy féle hem-kötő doménnel rendelkezhetnek; a hem-kötő PAS doménnel, globin-kapcsolt szenzorral (GCS, „globin coupled sensor”), CoxA-val („CO-sensing transcription activator”) és hem-NO-kötő (HNOB) alegységgel. Az ezekhez kapcsolódó transzmitterek lehetnek: hisztidin protein kinázok, ciklikus nukleotid foszfodiészterázok, kemotaxis metil-karrier protein receptorok és hélix-hurok-hélix („helix-loop-helix”) vagy hélix-fordulat-hélix („helix-turn-helix”) transzkripció faktorok. Az NO elsődleges és legismertebb receptora egy hem alapú szenzor fehérje a guanilát ciklázok nitrogén oxid szenzitív csoportja.

#### **A cGMP függő NO jelátvitel**

A **guanilát cikláz**okkal kapcsolatos ismereteink az állati ciklázok jellemzéséből állnak rendelkezésünkre, hiszen növényekben csak 2003-ban azonosítottak guanilát cikláz (Ludidi, 2003).

A guanilát ciklázoknak (GC, guanilil cikláz, guanil cikláz, EC 4.6.1.2) szubcelluláris lokalizációjuk alapján két csoportját különböztetjük meg; a citoszolikus szolubilis guanilát ciklázokét (sGC) és a sejtmembrán integrális fehérjéihez asszociálódott membrán-kötött guanilát ciklázokét (mGC). A guanilát ciklázok közötti alapvető különbség az, hogy míg a sGC NO által aktivált, addig a mGC specifikus peptidek által. Egyes publikációk szerint, a sGC is sejtmembránhoz asszociált, közel a NOS-hoz és csak aktiválódása után válik oldhatóvá, így a 'szolubilis' megnevezés helytelen (Feussner, 2001; Lin, 2005).

Az NO szenzitív sGC heterodimer, alfa ( $\alpha$ , 73-82 kDa) és béta ( $\beta$ , 70-76 kDa) alegységekből felépülő hem protein. Az NO vas-hem-hez való kötődése olyan konformációs változást (Fe-His kötés felbomlása) idéz elő a fehérje szerkezetében, mely

aktiválja az enzimet (Marti, 2005). Az aktív enzim, pedig a guanozin trifoszfát (GTP) - ciklikus guanozin trifoszfát (cGMP) átalakítást katalizálja.

Az enzim deaktivációjának módja egyelőre vitatott kérdés, jelenleg két lehetséges magyarázata van. Az első szerint az NO egyszerűen ledisszociál a hem csoportról, ami konformációs változáson keresztül az enzim aktív állapotának megszűnéséhez vezet. A második hipotézis pedig valamilyen külső faktor jelenlétét (pl. glutation) feltételezi, mely megbontja az NO-vas kötést és gyors NO disszociációt idéz elő (Brandish, 1998).

A sGC  $\beta$  alegységének N-terminális meghosszabbítása két globuláris domént tartalmaz. Az egyik a HNOB („Heme NO Binding”) domén, melyben a hem kovalensen kötődik egy hisztidin oldallánchoz. A másik, a HNOBA („HNOB associated”) domén, mely a HNOB és a katalitikus cikláz domén között helyezkedik el. Bakteriális eredetükre utal, hogy mindkét domén előfordul baktériumokban is, önállóan vagy fuzionálva más enzimekkel (Lakshminarayan, 2003). A hemoglobinban található porfirin szerkezete azonos a sGC  $\beta$  alegységével. A sGC azonban csak NO-t (esetleg CO-t) köt,  $O_2$ -t nem, annak ellenére sem, hogy az  $O_2$  intracelluláris koncentrációja jóval nagyobb, mint az NO-é (állati sejtek esetén;  $[NO]_{IC} \approx 10$  nM,  $[O_2]_{IC} \approx 20-40$   $\mu$ M) (Boon, 2005). A kérdés, hogy hogyan lehetséges mindez, nem teljesen tisztázott, annyi azonban valószínűsíthető, hogy a sGC kinetikai szelekciót használ az  $O_2$ -el szemben (Boon, 2005). Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a HNOB és HNOBA domének funkcionálisan hasonlóak a CACHE és CHASE doménekhez, melyek pedig a növényi citokinin receptorok ligand kötő alegységei (Anantharaman, 2001).

Állati rendszerekben a cGMP út „downstream” elemei; a cGMP-függő protein kinázok (PKG), ciklikus nukleotid kapuzó ion csatornák (CNGCs) és foszfodiészterázok (Lucas, 2000; Kopperud, 2003; Hoshi, 1995). Egyre több bizonyíték

található arra, hogy a cGMP kulcs szerepet játszik a növényi sejtek homeosztázisban is (Ehsan, 1998; Ehsan, 1998; Moutinho, 2001). Növényekben azonban jobbra még felderítetlen, hogy milyen elemei vannak a ciklikus nukleotidok (cGMP, cADPR) által kiváltott jelátviteli folyamatoknak. Az *Arabidopsis thaliana* genomjában nemrég sikerült csak azonosítani egy 20 tagból álló CNGC géncsaládot (Ludidi, 2003). Mindeztáig nem sikerült növényi PKG homológokat találni, habár biokémiai adatok arra engednek következtetni, hogy növényekben is léteznek ciklikus nukleotid-reszponzív protein kinázok (Newton, 1999).

### **A cGMP független jelátvitel**

#### **A cGMP független jelátviteli út receptorai és másodlagos hírvivői**

Míg az NO – sGC kölcsönhatás az enzim aktiválását eredményezi, az NO – citokróm c oxidáz interakció az enzim gátlásához vezet. A sGC nitrogén oxid kötő doménjének ligand specifikációja nagyon hasonló a bakteriális eredetű **citokróm c oxidáz** (EC. 1.9.3.1) hem alapú szenzorának ligand specifikációjához (Lawson, 2000). A citokróm c oxidáz a mitokondriális légzési lánc terminális elektron akceptora. Az enzim három fémion központot tartalmaz; egy réz-réz dimert ( $\text{Cu}_A$ ), egy hem A-t és egy binukleáris hem-réz kapcsolt központot (hem  $a_3/\text{Cu}_B$ ) (Yoshikawa, 2000). Az NO a redukált citokróm c oxidáz binukleáris hem-réz központjához kapcsolódik, ahol az  $\text{O}_2$ -kötés kompetitív inhibitora. Noha, az NO az oxidált állapotú citokróm c oxidázzal is képes kölcsönhatás kialakítására, ebben az esetben a binukleáris központ réz feléhez kapcsolódik a vas fél helyett. Ez utóbbi interakció magas  $\text{O}_2$  tenzióval következik be. Ilyen körülmények között a nitrogén oxid a már megkötött  $\text{O}_2$ -vel reagál nitrát képződése közben, az enzim inaktiválódását eredményezve (Cooper, 2002). Az NO

mindkét esetben inaktiválja az enzimet, gátolja az O<sub>2</sub> fogyasztást és az ATP termelését a sejtlegzés megakadályozása révén (Gow, 2004). A növényeknek van egy speciális válasza az NO általi sejtlegzés gátlásra. Rendelkeznek ugyanis a citokróm c oxidáz mellett egy másik terminális elektron akceptorral is, mely a sejtlegzés egy alternatív (cianid rezisztens) útját biztosítja számukra, ez az **alternatív oxidáz** (AOX, EC 1.-.-.-) (Mcintosh, 1994; Vanlerberghe, 1997). Minthogy a NO gátolja a citokróm utat, de nem vagy csak kis mértékben az alternatív sejtlegzést (Millar, 1996), így elképzelhető, hogy az AOX a magasabb rendű növények NO toleranciájának kialakításában játszik szerepet (Millar, 1997). Arabidopsis növényen és sejt kultúrában e feltételezés bizonyítást nyert, tudniillik megemelkedett NO koncentráció indukálta az AOX transzkripcióját és az enzim aktivitását is (Huang, 2002).

A nitrogén oxid képes kölcsönhatásba lépni egyéb, nem hem központot tartalmazó fehérjékkel is, mint például a **metallotioneinnel** (*metallothionein*, MT). Ez a ciszteinben gazdag fehérje általában nagy affinitással köti a kétértékű kationokat, de leginkább a cinket részesíti előnyben. Az NO kötődése metallotioneinhez cink felszabaduláshoz vezet, megnövelve a cink intracelluláris koncentrációját, ami különböző jelátviteli utakat aktivál. A MT-nek biológiai funkciója igen sokrétű, citoprotektív hatása van fém toxicitás ellen, antioxidáns hatása oxidatív stressz esetén, szabályozó funkciója proliferációhoz, differenciációhoz és apoptózishoz kapcsolódóan (Sato, 1993; Nagel, 1995; Cherian, 2000; Jayasurya, 2000). Növényekben bohócvirágban (*Mimulus guttatus*) azonosítottak először metallotioneint (de Miranda, 1990). A növényi MT-ek a fémionok homeosztázisának és a tolerancia folyamatok kialakításában vesznek részt (Cobbett, 2002), expressziójuk megnő öregedő levelekben és hajtásokban (Buchanan-Wollaston, 1994; Yu, 1998; Miller, 1999; Chen, 2003), érő gyümölcsökben (Davies, 2000), tapétum sejtekben (Charbonnel-Campaa, 2000) és

sebzett szövetekben (Choi, 1996). Paratölgyben (*Quercus suber*) szerepe van az oxidatív stressz kivédésében (Mir, 2004), dohányban (*Nicotiana plumbaginifolia*) pedig citokinin indukált génként írták le (Thomas, 2005). Ez a szignalizációs mechanizmus jó példa arra, hogy hogyan befolyásolhatja egy redox-aktív molekula (NO), egy redox-inszenzitív molekula (cink) intracelluláris homeosztázisát.

A metallotionein azonban nem az egyetlen metallotiolát protein, melyhez az NO kapcsolódni képes. Az **akonitáz** (EC 4.2.1.3), a Krebs-ciklus egyik kulcs enzime, egy 4Fe-4S csoportot tartalmazó fehérje, mely a citrát-izocitrát izomerációt katalizálja. Két izoformája létezik, egyik a mitokondriumban, míg a másik a citoszólban lokalizált. Egy részleteiben tisztázatlan folyamat révén az NO inaktiválja mindkét izoformát (Hausladen, 1994; Castro, 1994; Drapier, 1996). A mitokondriális akonitáz gátlása a sejt energia anyagcseréjének csökkenését idézi elő, ami egyfajta védelmet jelent oxidatív stressz ellen, hiszen az enzim inaktivációja a mitokondriális elektron láncban az elektron áramlás mérséklődését okozza, csökkentve ezáltal a sejtlegzés során képződő reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségét (Gardner, 1991). A citoszólikus akonitáz egy különleges izoformája, a vas szabályozó protein (IRP, „iron-regulatory protein”). Az IRP, olyan hírvivő RNS-ket (mRNS, „messenger” RNS) köt, melyek vas érzékeny elemet (IRE, „iron-responsive element”) tartalmazó konszenzus szekvenciával rendelkeznek. Az IRE mRNS 5’ nem átíródó végének kötődése IRP-hez megakadályozza az RNS átíródását, míg a 3’ nem átíródó vég kötődése megnöveli az átírat (transzkriptum) stabilitását. Az NO a citoszólikus akonitáz — IRP átalakulást segíti elő, így közvetlenül befolyásolja a sejt vas homeosztázisát. Tehát az akonitázok redox és NO szenzoroknak tekinthetők. Ezen szerepük növényekben is igazolt. Dohány akonitázok, hasonlóan állati homológjaikhoz gátolhatók NO kezeléssel (Navarre, 2000; Murgia, 2002).

Az NO jelátviteli folyamat fontos komponense az intracelluláris kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Állatokban a PKG a rianodin-szenzitív kalcium csatornák (RYR) aktiválásán keresztül mobilizálja intracelluláris raktáraiból a kalciumot (Reyes-Harde, 1999; Willmott, 1996), a cADPR másodlagos hírvívő molekula segítségével. A RYR aktiválása más úton, S-nitrozilációval is megtörténhet (Xu, 1998). Annak ellenére, hogy növényekben viszonylag keveset tudunk az NO-indukált transzdukciós kaszkádokról, jó néhány adat áll rendelkezésre a másodlagos hírvívő  $\text{Ca}^{2+}$  ezen folyamatokban betöltött szerepéről. A nitrogén oxid részt vesz például dohány sejtekben a hiperozmotikus vagy az elicitor kriptogein közvetítésével kiváltott citoszólikus szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedésében (Gould, 2003; Lamotte, 2004). Farmakológiai kísérletek pedig arra engednek következtetni, hogy a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  fontos komponense az NO okozta gázcserenyílás záródásnak (Garcia-Mata, 2003; Neill, 2002; Neill, 2002), valamint *Vicia faba* és dohány gázcserenyílás sejtjeinek NO-val való kezelése is intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedést vált ki (Garcia-Mata, 2003; Lamotte, 2004). Mindezeket párhuzamba állítva elképzelhető, hogy növényekben az NO egy  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló intracelluláris vegyület (Lamotte, 2005).

A  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák mellett, növényekben az NO hatás célpontjában a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) állnak. A MAPK-ok a jelátviteli folyamatok fontos mediátorai, közvetítők a külső jel felfogása és az erre adott specifikus válasz megszületése között, hisz szubsztrátjaik főként transzkripciós faktorok (Treisman, 1996). Részt vesznek különböző biotikus és abiotikus stressz indukált jelátviteli kaszkádokban és szabályozzák a sejtciklust valamint az egyedfejlődési folyamatokat. NO kezelésnek dohányban és Arabidopsisban is MAPK aktivitás stimuláló hatása van (Clarke, 2000; Capone, 2004; Kumar, 2000). Uborkában, az indol ecetsav (IES) indukálta járulékos gyökéreképződés során egy NO-függő MAPK jelátviteli kaszkád

aktiválódik (Pagnussat, 2004). Az azonban nem ismert, hogy az NO általi MAPK aktiváció direkt úton vagy valamilyen más faktor közvetítésével megy végbe.

### **Az S-nitroziláció: kölcsönhatás tiolokkal**

A nitrogén oxid, mint redox kapacitással rendelkező molekula képes fehérjéken aminosavat, aromás gyűrűket, alkoholokat és redukált ként (tiol) nitrozilálni. Habár régóta ismert az NO ezen képessége, az efféle fehérje módosításnak csak nemrégóta tulajdonítanak fiziológiai jelentőséget. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a nitroziláció egy kémiai, nem pedig enzim(ek) által katalizált reakció. Ámbár a nitroziláció specifikusnak tekinthető, merthogy egyrészt nem minden elérhető cisztein oldallánccal rendelkező fehérje nitrozilálódik. A szubcelluláris lokalizáció és az adott kémiai környezet (pl. az NO helyi koncentrációja és a molekulák melyekkel reakcióba lép, mint a  $O_2^{\cdot -}$  és a hem proteinek) szabják meg, hogy melyik fehérje nitrozilálódik. Másrészt pedig egy nitrozilálás előtt álló fehérje nem minden cisztein alegysége nitrozilálódik. Jó példa erre a p21<sup>Ras</sup> fehérje, melynek öt ciszteinjéből csak egyetlen egy nitrozilálódik (Lander, 1995). További példa a rianodin receptor, melynek 84 szabad —SH csoporttal rendelkező ciszteinje van és ebből mindössze 12 fog nitrozilálódni (Xu, 1998). A jelenség magyarázatát a fehérjék negyedleges szerkezetében kell keresnünk, valamint létezik egy konszenzus fehérje szekvencia (XYCZ), mely nitrozilálásra hajlamosít (Stamler, 1997).

Egy a közelmúltban megjelent publikáció szerint (Stamler, 2001) 115-re tehető az SNO kialakítására képes fehérjék száma állati rendszerekben. Növényekben ez év tavaszán, Lindermayr és munkatársai 67 nitrozilált fehérjét azonosítottak proteomikai megközelítéssel *A. thaliana*-ban (Lindermayr, 2005). Az ily módon azonosított fehérjéket öt csoportra osztották; stressz-függő (pl. glutation S-transzferáz),



szignalizációban/regulációban részt vevő (pl. elongációs és iníciációs faktorok), redox-függő (tioredoxin, glutaredoxin), citoszkeletális (aktin, tubulin) és egyéb fehérjékre (metabolizmusban, fotoszintézisben közreműködő enzimek). Bizonyított továbbá, hogy az NO S-nitroziláció útján szabályozza a gázcsere nyílás zárósejtek  $K^+$  csatornájának (Sokolovski, 2004) és a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáznak az aktivitását (Lindermayr, 2005) is. Érdeemes megemlíteni, hogy Arabidopsisban a hemoglobin fehérje (Hb1) is képes S-nitrozilálódni (Perazzolli, 2004).

Az elmúlt években, mint láttuk, számos fehérjéről bizonyosodott be, hogy a nitrogén oxid képes nitrozilálni. A folyamat egy többlépéses transznitrozációs/transzfer reakció, mely vagy redox aktív molekulák NO-val történő kölcsönhatásának, vagy metalloproteinek (pl. ceruloplazmin) által katalizált reakciónak az eredménye (Inoue, 1999; Gaston, 2003). A transznitrozáció az a folyamat, ami során az NO ekvivalens egyik molekuláról a másikra kerül át. Az így módon keletkezett SNO-nak, a citoszolikus környezet nem kedvez. Annak érdekében, hogy az SNO módosítást hordozó fehérjék megmeneküljenek a redukzív vagy transznitrozatív átalakulástól, kompartmentalizálódnak; membránokban, lipofil fehérjékben, intersticiális terekben vagy vezikulumokban halmozódnak fel (Gaston, 2003).

Az SNO bizonyos fehérjék aktivitását fokozza (pl.  $p21^{Ras}$ , tioredoxin), másokét ezzel szemben gátolja (pl. kaszpázok) (Haendeler, 2002; Mannick, 1999; Lander, 1997). Különböző enzimek aktivitásának befolyásolása mellett az SNO modifikáció számos transzkripciós faktor működésére is hatással van, befolyásolva különböző gének kifejeződését. Ilyen nukleáris szabályozó fehérje a hipoxia indukált faktor (HIF-1), stimuláló proteinek (Sp1 és 3), a nukleáris faktor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) és a prokarióta transzkripciós faktor OxR is (Gaston, 2003).

Az SNO kötés degradációja is pontosan szabályozott, történhet inorganikus vagy organikus úton. Elemi rézzel, aszkorbáttal vagy higannyal történő reakció az SNO kötés felbomlásához vezet, de ismert a kötés fotolitikus hasadása is (Mcaninly, 1993; Gaston, 1999), habár ezeknek a kölcsönhatásoknak igen csekély fiziológiai jelentőségük van. Organikus lebomlásukat enzimek katalizálják. A tioredoxin rendszer (Nikitovic, 1996), a glutation peroxidáz (Hou, 1996), a  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz (Hogg, 1997), a xantin oxidáz (Trujillo, 1998) és a glutation-dependens formaldehid dehidrogenáz (Jensen, 1998; Liu, 2001) mind kapcsolatba hozhatók az SNO katabolizmusával.

Mint az előzőekben láthattuk, állati rendszerekben kezd világossá válni, hogy milyen utakon szintetizálódik, hogyan kompartmentalizálódik, majd bomlik fel az SNO kötés és hogy milyen hatással van ez a modifikáció az azt hordozó fehérjék aktivitására. Növényekben azonban ezek a folyamatok jórészt még felderítetlenek.

Összegzésül elmondható, hogy az S-nitroziláció nem csupán egy fehérje módosítás, hanem egy redox szignál. Az S-nitroziláció, éppen úgy mint a foszforiláció, kovalens módosításokkal precízen szabályozott gyors és reverzibilis poszttranszlációs modifikáció, mely befolyásolja minden élő sejt és organizmus fiziológiai funkcióját. Segítségével képes a sejt megfelelően reagálni az oxidánsok és a szabadgyökök keltette oxidatív stresszre, a megváltozott redox környezetre, lehetővé téve a sejt vagy az organizmus számára a változó környezethez való alkalmazkodást.

### Tirozin nitráció

Fehérjék tirozin oldalláncain nitro csoport ( $-\text{NO}_2$ ) képzése 3-nitrotirozin keletkezéséhez vezet *in vitro*. A folyamat hasonlóan az S-nitrozilációhoz specifikus, nem minden fehérje alkalmas rá és csak bizonyos tirozinok nitrálhatók (Souza, 1999). Specifitásán kívül egyre több adat bizonyítja reverzibilis sajátosságát (Kamisaki, 1998; Gow, 1996). Habár nitrotirozinok keletkezését elsősorban patológiás eseteknél (kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségek) és oxidatív stressz markerként írták le (Ischiropoulos, 1998), normál, fiziológiai körülmények között is ki lehet mutatni jelenlétüket.

A fehérje tirozin nitrációt főként metalloproteinek katalizálják. Bőséges irodalmi adat bizonyítja, hogy peroxidázok (mieloperoxidáz, eozinofil peroxidáz), mioglobin és citokróm P-450 katalizálja a nitrit oxidációját nitrogén dioxidá, mely nitrálja a tirozin láncokat (Van, 1997; Brennan, 2002; Wu, 1999; Irie, 2003; Naseem, 2000). A Mn szuperoxid diszmutáz (MnSOD) (MacMillan-Crow, 1996) és a prosztaciklin szintáz (Schmidt, 2003) saját nitrációjukat katalizálják peroxinitrit jelenlétében. További nem enzimikus források lehetnek a peroxinitrit és széndioxid reakciójából származó intermedierek és a nitrit savanyodásából származó salétromos sav, melyek mind nitrációt okoznak (Gow, 2004).

A tirozin nitráció funkciónyeréssel vagy funkcióvesztéssel járó kovalens fehérje módosítás. Egy említésre méltó példa funkcióvesztésre a MnSOD esete, melyet a peroxinitrit helyspecifikusan nitrál (Tyr-34), így az enzim inaktív állapotba kerül. Citoszkeletális elemeken, aktinon és tubulinon is igazoltak tirozin nitrációt (Radi, 2004). Az  $\alpha$ -tubulin nitrációja növényekben is ismert jelenség (Blume, 2005). Növényekben igen korlátozottak ismereteink tirozin nitráció jelenlétére és jelentőségére vonatkozóan. Ezért különösen izgalmas volt olvasni Sakamoto és munkatársai

munkájáról, melyben arról számolnak be, hogy növényi nem szimbionta hemoglobinok (AtGLB1, AtGLB2, AtGLB3) peroxidáz-szerű aktivitásukkal nitrit és hidrogén peroxid jelenlétében tirozin nitrációt okoznak saját magukon ill. más fehérjéken (Sakamoto, 2004). Az AtGLB1 hírvivő RNS akkumulációja nitrittel kezelt *Arabidopsis th.* csíranövényekben arra enged következtetni, hogy szoros kapcsolat van a nitrit és a nem szimbionta hemoglobinok között.

### **A növényi hemoglobinkról avagy hogyan szabaduljunk meg az NO-tól?**

A nitrogén oxid szignalizáció teljes megértéséhez ismernünk kell azokat a folyamatokat is, melyek az NO szignál „kikapcsolásáért” és/vagy a felesleges vagy toxikus NO eltávolításáért felelősek. Arról, hogy hemoglobinok léteznek növényekben is, azóta van tudomásunk, mióta állati rendszerekben megkezdték jellemzésüket. Növényekben az elsőként azonosított hemoglobinok a leghemoglobinok. Ezek a hüvelyesek gyökérgümőiben millimólos koncentrációban található monomer szerkezetű fehérjék, a szimbionta nitrogén fixáció alapvető komponensei (Appleby, 1984). 1988-ban Bogusz és munkatársai, olyan hemoglobin család létezéséről számoltak be, mely alacsony koncentrációban van jelen zuzmóktól zárvatermőkig az összes növény fajban (Bogusz, 1988). Ez a nem-szimbionta hemoglobinok névre keresztelt család további két osztályra osztható; 1-es (Hb1) és 2-es (Hb2) típusú hemoglobinokra. Tagjainak nagy affinitásuk van oxigénhez, de kicsi az oxigén disszociációs együtthatójuk, így aligha vehetnek részt az oxigén szállításában (Kundu, 2003). Habár fiziológiai szerepükről még nem tudunk sokat, annyi bizonyos, hogy az 1-es típusú hemoglobinok expressziója cukorra és alacsony oxigén koncentrációra (hipoxia) aktiválódik (Taylor, 1994; Seregélyes, 2000; Hunt, 2001). A hipoxia egy olyan stressz állapot, ami során nagy mennyiségben szabadul fel NO (Dordas, 2003). Igazolt tény, hogy a Hb1

kölcsönhatásba lép NO-al *in vitro*; *A. thaliana*-ból (Perazzolli, 2004), árpából (Igamberdiev, 2004) és lucernából izolált (Seregélyes, 2004) nem-szimbionta hemoglobinok képesek az NO nitráttá történő NAD(P)H függő átalakítására. Úgy tűnik, hogy a Hb1 csökkenti az alacsony oxigén koncentráció hatására megnövekedett NO szintjét, védelmet nyújtva a növény számára hipoxia alatt. Nem véletlen hogy leginkább csírázó magvakban fejeződik ki. A 2-es típusú hemoglobinok gyökérben, levélben és virágban is expresszálódnak, fiatal növényekben citokinin által indukálhatók.

Habár az NO fő metabolikus útja kétségtelenül annak hemoglobin általi nitráttá oxidálása, más enzimek például a xantin oxidáz, a glutation peroxidáz vagy a redukált glutation reduktáz is képesek az NO vagy az NO kapcsolt formák lebontására (Trujillo, 1998; Sies, 1997; Diaz, 2003). Ezen enzimek NO metabolizmusban betöltött szerepe még nem tisztázott.

### **Az NO transzport mechanizmusai**

Habár a nitrogén oxid gáz halmazállapotú molekula, NO prekursorok, az etilén prekursor ACS (1-aminociclopropán-1-carboxil sav) analógiájára, szolgálhatnak NO raktárként, esetleg hosszabb vagy rövidebb távolságra transzportálódhatnak (Jackson, 2002). Állatokban például az S-nitrozohemoglobin kimutatása vérben adta az ötletet ahhoz, hogy ezt a formát esetleg keringő NO raktárnak tekinthessük (Jia, 1996). Az ötletet azóta elvetették és mára már sokkal valószínűbb, hogy a vérben keringő nitrit funkcionál NO forrásként (Gladwin, 2000), éppen úgy, ahogy növények gázcsereenyívásaiban teszi (Desikan, 2002). Annak is fennáll a lehetősége, hogy a xilémben vagy floémában szállítódó S-nitrozoglutation (GSNO) a mobilis NO raktár. Képzeljük csak el, hogy a GSNO a nitrittel együtt a gyökérből a szárba transzportálódik, onnan a gázcsereenyívásokhoz, ahol azok záródását idézi elő, egy ABS független úton.

Csábító lehetőségnek tűnik továbbá a növényi hemoglobinok, mint esetleges NO szállító és raktározó funkcióra alkalmas fehérjék felvetése is (Hunt, 2001). Az NO szállítás és raktározás pontos mechanizmusának tisztázására azonban még várnunk kell.

### **NO és génexpresszió**

Az előző fejezetekből kiderült, hogy az NO milyen sokféle fejlődési és fiziológiai folyamatban vesz részt, ezért elkerülhetetlen a nitrogén oxid kezelés utáni gén expresszióban bekövetkező változások megemlítése. Azt, hogy az NO gén kifejeződést indukál, növény – patogén kölcsönhatás során írták le először (Durner, 1998). Azóta több kísérlet is bizonyítja, hogy a patogén támadás és UV-B stressz alatt felszabaduló NO elsősorban védekezési gének (*PAL*, *CHS*, *PR-1*) kifejeződését szabályozza (Delledonne, 1998; Klessig, 2000; Mackerness, 2001). Arabidopsis növényben és sejtszuspenzióban az NO elősegíti a ferritin felhalmozódását mRNS és fehérje szinten is (Murgia, 2002).

NO donorral (NOR-3) kezelt Arabidopsis sejtszuspenzió génexpressziós mintázatának DNS-csip („microarray”) technikával megvalósuló vizsgálata, számos NO indukált gént tárt fel közöttük patogenézishez köthető géneket, peroxidázokat, glutation S-transzferázt és jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérjéket kódoló géneket (Huang, 2002). A legerősebb indukciót (8,4-szeres aktiváció) az *AOX1* gén mutatta, amit Northern analízissel is sikerült igazolni. Az alternatív oxidázokról a korábbiakban már ejtettünk szót. Az aktivált gének bioinformatikai analízise során nem sikerült szekvenciájukban semmilyen közös *cis* regulátor elemet azonosítani. A kérdés, hogy az NO milyen mechanizmus útján indukál gén expressziót, egyelőre költői. Ha viszont belegondolunk, hogy az NO képes a fehérjék térszerkezetét megváltoztatni (nitráció, nitroziláció ill. átmeneti fémekhez való kötődés) és ráeszmélünk, hogy a transzkripció

faktorok leggyakoribb csoportja éppen cink-ujj motívumot tartalmaz, talán megsejthetünk valamit a kérdésünkre adandó válaszból. Spekulációnk, miszerint az NO gén kifejeződést szabályozó tulajdonságát, a cink-ujj motívumot tartalmazó transzkripciós faktorokra gyakorolt hatása által éri el, nem is annyira valószínűtlen. Állati rendszerekben egyre több adat bizonyítja, hogy a transzkripciós faktorok poszttranszlációs modifikációja hatással van egyes gének kifejeződésére, különösen a sejt redox állapotában történő változáskor. Az NO képes S-nitrozilálni a cink-ujj transzkripciós faktorokban található, cink-kén alegységek SH csoportjait, a cink-ujj szerkezet reverzibilis szétszakítását okozva, ami viszont lehetőséget ad gének transzkripcionális szabályozására (Kroncke, 2000; Kroncke, 2001; Kroncke, 1994; Kroncke, 2003).