

**SPECIFIKUS FEHÉRJÉK
A *RICINUS COMMUNIS* L.
ROSTACSÓ EXUDÁTUMÁBAN:
ELVÁLASZTÁS, JELLEMZÉS, FUNKCIÓ**

Tézisek

DR. PÉCSVÁRADI ATTILA

József Attila Tudományegyetem
Növényélettani Tanszék
Szeged
1997

TARTALOM

BEVEZETÉS	3
CÉLKITŰZÉS	10
KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA (TÉZISEK)	16
UTÓSZÓ	27
IRODALOM	28
MELLÉKLET	30



BEVEZETÉS

A magasabbrendű növények teste jelentős mértékben differenciálódott, szervekre (szövetekre) tagolt. Ennek egyik következménye, hogy a *source* (asszimilátumokat termelő szervek) és a *sink* (tápanyagfelhasználó helyek: növekedési zónák, raktározó szervek) elkülönültek egymástól.

A phloem egyike a növényi test specializált szállítórendszereinek, melyek biztosítják a *source* és *sink* közötti szabályozott kölcsönhatás strukturális és funkcionális feltételeit, és eleget tesznek a növényi test felépítéséből eredő egyéb követelményeknek, például annak, hogy: - az egyes növényi részek C és N vegyületek iránti igénye az egyedfejlődés folyamán változó, - a fixált C a levelekből származik, a N vegyületek és más ásványi anyagok a gyökérből (xylem), azaz biztosítják ezeknek a szubsztrátoknak az egyidejű, egymással ellentétes irányban történő hosszútávú transzportját (5, 6, 7, 11, 12, 13, 14).

A phloemben a tápanyagok mellett kémiai szignál-molekulák és fehérjék transzlokálódnak, ez utóbbiak élettani szerepe általános előfordulásuk ellenére tisztázatlan.

A phloem

A phloem morfológiailag és élettanilag komplex szövet, melynek felépítésében számos sejtfeleség vesz részt: rostaelemek, különféle parenchyma sejtek, rostok, sclereidák, esetenként idioblasztok. A phloem konduktív egységei a rosta elemek. A kétszikűek esetében ezeket rostacső elemeknek nevezzük, mind egyedfejlődésükben, mind funkcionálisan szoros kapcsolatban vannak speciális parenchyma sejtekkel, az ún. kísérősejtekkel.

A rostacső elem

Ellentétben a xylem edényhálózatával, melynek élettelen sejtjei “*super-apoplast*”-ként viselkednek, a phloem valamennyi eleme élő sejt, a rostacső elemek “*super-symplast*”-tá kapcsolódnak. A xylem tracheák falára a belső negatív nyomás miatt jelentős húzóerő hat (a xylem transzport fő hajtóereje a transpiráció) ezért ezek-

nek az elemeknek a fala másodlagos vastagodással megerősített, körkörösen rendeződött lignin bordák gátolják meg a tracheák összeroppanását.

A phloem nyomásviszonyai ezzel ellentétesek, a rostacső elem belsejében a nyomás pozitív, a sejtfalakra ható erőt a szomszédos szöveti kötelékben levő sejtek ellensúlyozzák. A rostacső elemek szilárdságát fokozó sejtfalmódosulások nem alakulnak ki. A sejtfal meghatározott területein pórusok nyílnak. Ezeken keresztül gazdag citoplazmatikus kapcsolat alakulhat ki a szomszédos rostacső elemek között (a rostalemezen át) ill. a kíséresejtekkel.

Az érett, transzlokáló rostacső elem kialakulása során a fiatal, parenchyma jellegű sejtben drámai szerkezeti átalakulások zajlanak le. Szelektív autofág folyamatok révén az organelumok egy része eltűnik, a megmaradók pedig parietálisan rendeződnek el.

A kétszikűek érett rostacső elemei nem tartalmaznak sejtmagot. Az érés kezdeti stádiumában a mag lebonyezetté válik, majd összezsugorodik, a kromatolízis a megfesthető kromatin fokozatos eltűnéséhez vezet. A sejtmag és a magvacska degenerálódik, a folyamat a maghártya felszakadásával fejeződik be.

A fiatal rostacső elemek endoplazmatikus retikuluma durva felszínű (*rough-ER*), gazdag riboszóma-populáció kötődik hozzá. Az ER-ciszternák a citoplazmában random elrendeződésűek. A differenciálódás előrehaladtával a síma felszínű ER aránya megnő, a riboszómák fokozatosan eltűnnek, a citoplazma szabad riboszómáival együtt. Az ER ciszternák egymásra halmozódnak és parietális helyzetet vesznek fel. Az érett rostacső elemekben az ER komplex hálózatként látható a plazmalemma mentén, gazdag anasztomizáltság, fenesztráltság jellemzi. Ennek a strukturának fontos szerepet szánunk a phloem feltöltési (*loading*) mechanizmusában.

A plazmalemma megtartja integritását az érett rostacső elemekben, membrántranszport rendszere esszenciális a phloem anyagforgalmában. A tonoplaszt eltűnik, megszűnik a vakuolum és a citoplazma elhatároltsága.

A plasztiszok és a mitochondriumok túlélnek az autofág támadást, valószínűleg az védi meg őket, hogy külső membránjuk összetétele hasonló a plazmalemmáéhoz. Parietális helyzetet vesznek fel, beágyazódnak az ER hálózatába. A rostacső elem turgorának fenntartásához szükséges minimális energia a légzésből származik, azonban a saját kisméretű mitochondriumai ehhez nem elegendőek, az energia egy része a kíséresejtekből származik.

A rostacső elem az érési folyamat végére olyan differenciált sejté válik, mely egy funkcionális egység részeként tökéletesen ellátja feladatát, azonban életképességének fenntartásában a kísérősejtek együttműködésére (metabolizmusára) utalt.

A kísérősejtek

A phloem parenchyma sejtjei közül a kísérősejtek kapcsolódnak a legszorosabban a rostacső elemekhez, nemcsak ugyanannak a sejtnek az osztódásából származnak, hanem azokkal funkcionális egységet alkotnak. Citoplazmatikus kapcsolódásuk olyan szoros, hogy a rostacső elem halálával a kísérősejt is elpusztul.

A rostacső elemmel ellentétben a kísérősejteket nem degradálják autofág folyamatok. Fejlődésük során citoplazmájuk denzitása a megnövekedett riboszóma populáció, és a mitochondriumok nagy száma miatt megnő. Sejtmagjuk működőképes marad. A rostacső elem és a kísérősejt között speciális plazmodezmák révén citoplazmatikus kapcsolat alakul ki. A rostacső elem oldalfalán egyetlen nagyobb pórus nyílik, melyet kallóz szegélyez. A sejtfa a kísérősejt oldalán félgömbszerűen megvastagodik, mely bedomborul a sejt lumenébe. A vastagodást nagyszámú, elágazó dezmotubulus szeli át, melyek a pórusban egyesülnek.

A kísérősejtek ultrastrukturájuk miatt a szekréciós sejtekre hasonlítanak. A kísérősejt élénk metabolikus kapcsolatban van a rostacső elemmel, feltételezik, hogy fehérjék (>10 kD) is a plazmodezmákon jutnak át a rostacső elembe, noha a plazmodezmák SEL (*size exclusion limit*) értéke 1 kD alatti.

A P-proteinek

A P-protein a phloem strukturális fehérjéinek általánosan használt elnevezése, Cronshaw 1975-ös definícióját idézve: “fehérje jellegű anyag, mely fény-, vagy elektronmikroszkóppal megfigyelve elég jellegzetes ahhoz, hogy saját nevet kapjon”. Általában a kis molekulású mobilis fehérjéket nem sorolják közéjük.

A kétszikűek és sok egyszikű növény rostacső elemeiben néhány kivételtől eltekintve mindig megtalálhatók a P-proteinek. A nyitvatermők és az alacsonyabbrendű virágtalan növényekből általában hiányzik. A rostaelem differenciáltsági fokától, életkorától függően morfológiailag különböző P-proteineket tartalmaz. A fiatal sejtekben egyetlen fehérje-testként fordul elő, ami az érési folyamat előrehaladtával tubuláris, fibrilláris, filamentózus elemekből álló hálózattá alakul át,

amely parietálisan, ritkábban a rostacső elem lumenét lazán kitöltve helyezkedik el. A P-protein szintézisét követően a riboszómák eltűnnek a rostaelemből.

A P-proteinekkal kapcsolatban enzimaktivitásokat mutattak ki. Azonban ezek java része műterméknek bizonyult, és a rostaelem ill. a szomszédos sejtek citoplazmájának a roncsolódásából származott, így az enzimaktivításra vonatkozó ismeretek elég bizonytalanok. A P-proteinek között lektineket mutattak ki. A lektin-hidak arra szolgálhatnak, hogy a parietálisan elrendezett filamentum hálózatot a rostaelem membránjaihoz rögzítsék. Az így lehorgonyzott P-protein hálózat alkalmas arra is, hogy a plazmatiszokat, mitochondriumokat parietális helyzetükben megtartsa, szabad teret biztosítva ezzel a lumenben a tömeg-áramlásnak.

A P-proteinek a rostacső elemek statikus, immobilis strukturái, melyek nem mozognak az asszimilátum-áramlással. A P-proteinek a kallózzal együtt arra szolgálnak, hogy lezárják a sérült rostaelemek pórusait, ezzel képesek megakadályozni az asszimilátumok kiáramlását a szállítócsatornából. A védekezőrendszerben a kallóz-képződés a védekezés "második vonala". A kallóz-szintézis révén a pórusok eltömődése lassabb folyamat, azonban reverzibilis lehet, a rostaelem életében többször ismétlődhet. A kallóz képződése nemcsak sebzéskor fordul elő, hanem a nyugalmi állapot idején is ilyen módon blokkolódik a phloem, de hőkezelés is indukálhatja a kallóz-szintézist.

A P-protein hálózat kizárólag sebzéskor működik védekező mechanizmusként, a sejt életében egyszer. A rostacsőben a sebzés hirtelen nyomáscsökkenést okoz, a szabadba áramló sejt tartalom magával ragadja, és bepréseli a P-protein hálózat filamentumait a rostalemez pórusaiba. Az így kialakult dugó alkalmas a rostacső csaknem azonnali zárására, így a P-proteinek jelentik a védekezés első vonalát. Összefüggést mutattak ki az egyes növényfajok rostaelemeinek pórusmérete és P-protein tartalma között.

A phloem exudátum (rostacső nedv)

Exudáció

A phloem védekező (záró) mechanizmusának hatékony működése egyfelől igen előnyös a növény számára, mivel megakadályozza a phloem nedv, és ezzel asszimilátumok kiáramlását és elvesztését a sérülésen át, azonban az ilyen biztonsági szelepeknek a tökéletes működése nagyon megnehezíti a phloem hosszútávú

transzportjával kapcsolatos vizsgálatokat, a phloem nedv analízisre alkalmas mennyiségű kinyerését.

Vannak olyan növényfajok, amelyek talán a zárómechanizmus tökéletlensége miatt, a phloem sérülését követően hosszabb ideig (akár órákon át) exudálnak, a vágás vagy szűrés helyén folyadékcsapp jelenik meg, melyet általánosan elfogadottan phloem nedvnek (rostacső nedvnek) tekintenek. Ha az exudátum összetétele megfelel bizonyos kritériumoknak, az bizonyítja az exudátum rostacső eredetét.

A phloem exudátum gyűjtésére kidolgozott módszerek alapvetően két csoportba sorolhatók: i) a növényen ejtett bemetszésen alapuló technikák; ii) a növényből táplálkozó levéltetveket felhasználó eljárások (*aphid stylet technique*).

Metszésen alapuló eljárások

Ezek az eljárások az objektumtól függően a növényi test különböző részein ejtett bemetszésekkel nyitják meg a rostacsövet. Ez lehet a hajtás valamely részének részleges bemetszése, vagy teljes keresztülvágása, dekapitálása. Az eljárás hátránya, hogy roncsolja a környező parenchyma sejteket, az ezekből szabaddá váló sejttartalom szennyezheti az exudátumot; a xylem nedv keveredhet a phloem exudátummal; a bemetszés okozta hirtelen nyomáscsökkenés a rostacsőben roncsolhatja a rostacső elemek teljes citoplazmáját, és így az exudátumot egyébként nem mobilis fehérjék, P-proteinek, mitochondriumok, plasztiszok szennyezhetik.

Az említett hátrányok megfelelő növényfaj kiválasztásával, az eljárás technikai részleteinek változtatásával általában kiküszöbölhetők.

A módszer előnye, hogy a kinyert exudátum mennyisége akár több milliliter is lehet.

Levéltetvek felhasználásán alapuló eljárások (*aphid stylet technique*)

A módszer a növényből táplálkozó levéltetveket használja fel a rostacső megcsapolására. A rovar szipókáját a növénybe szűrve egyetlen rostacső elemet nyit meg. Ezt követően a rovar testét eltávolítják, a szipóka a szövetben marad, a rostacső magas belső nyomása kipréseli a phloem nedvet a szipóka nyitott végén.

A módszer hátránya, hogy rendkívül körülményes, speciális felszerelést igényel; csekély mennyiségű exudátum nyerhető ki vele, a cseppek a párolgás miatt be-

koncentrálódnak, esetleg beszáradhatnak; a használható növényfajok száma korlátozott.

A módszer előnye, hogy a legtisztább exudátum nyerhető vele, a rostaelemből vagy a szomszédos sejtekből, xylemből származó szennyeződés minimális; a rosta-elemet minimális stressznek teszi ki, a rostacsőben normálisan meglévő nyomásgrádi-entst alig változtatja meg; hosszú ideig (órákon át, sőt napokig) fenntartható a folyamatos exudáció.

A phloem nedv összetétele

Különbéle növényfajokból származó phloem exudátumok analízise azt mutatja, hogy összetételük nagyon hasonló, a phloem nedv enyhén lúgos kémhatású (pH 7-8), szárazanyag tartalmuk általában 15-25%. A legfőbb transzlokált szénhidrát komponens a szacharóz, a szárazanyagtartalom kb. 90%-a. Mannitol, raffinóz és néhány más cukor csak bizonyos fajokra korlátozottan fordul elő. Hexózok nem transzlokálódnak a phloemben. Előfordulásuk az exudátumban szennyeződésnek tudható be, például a sérült parenchyma sejtekből, vagy a sejt falban kötött invertázzal való érintkezésből eredhet. Az exudátum hexóz tartalma egyik kritériuma lehet az exudátum tisztaságának.

Az aminosavak mennyisége ugyancsak jelentős, (30-150 mM), a kationok közül a K^+ a legszámottevőbb (25-110 mM), Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 1-10 mM, szerves anionok, Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} 20 mM-nál kisebb koncentrációban fordulnak elő a *Ricinus communis* L. phloem exudátumában. Hormonok (auxin, citokinin, gibberellin, abszcizinsav) kimutathatók az exudátumokból. ATP 0,40-0,60 mM mutatható ki felnőtt ricinus növény phloem exudátumából.

A phloem exudátumok általában nem tartalmaznak nukleinsavakat, rizs exudátumában mutattak ki RNS-t, mely tRNS-nek bizonyult.

Fehérjék a phloem exudátumban

Az eddig megvizsgált phloem exudátumok közös jellemzője, hogy fehérjék mutathatók ki bennük, függetlenül attól, hogy metszéssel, vagy *aphid stylet* technikával gyűjtötték-e az exudátumot.

A *Cucurbitaceae* családba tartozó fajokból származó phloem exudátumok fehérje tartalma igen magas, elérheti a 10-60 mg/ml értéket. Ezekben az exudátumokban

nagy mennyiségű P-protein filamentumot mutattak, jelenlétük a rostacső elemek morfológiai sajátosságaival (nagy pórusok, tág lumen) magyarázható. A fehérje tartalom komponensei közt a nagy molekulásúak (115, 158, 220 kD) dominánsak. Jellegzetessége a tökfélék phloem exudátumának, hogy a levegő oxigénjének hatására gélesedik, a fehérjék egy része diszulfid-hidakkal összekapcsolódik. A gélesedés szulfhidril-reagensekkel (β -merkaptoetanollal) meggátolható.

Más fajok (nem a *Cucurbitaceae* családba tartozók) exudátuma normálisan nem tartalmaz P-proteint, a filamentumok megjelenését az exudátumban a rostacső elemek roncsolódásából eredő szennyeződésnek tekintik. Az oldható, mobilis fehérjék úgy tűnik általánosan előforduló alkotórészei a transzlokációs áramlásnak. Ezekre a fajokra jellemző fehérje koncentráció: 0,1-2,0 mg/ml, és ez az exudáció folyamán megközelítőleg állandó.

Bár a fehérjék jelenlétét a phloem exudátumban régen felismerték, a biokémiai vizsgálatok elsősorban a P-proteinekre, és a tökfélék phloem exudátumára korlátozódtak (enzimaktivitásokat, lektinteket mutattak ki), a többi faj mobilis phloem fehérjéit illetően kevés megbízható adat áll rendelkezésre.

CÉLKITŰZÉS

A *Ricinus communis* L. egyike azoknak a ritka növény fajoknak, melyekből tiszta phloem nedv, rostacső exudátum nyerhető, amely nem tartalmaz P-protein filamentumokat. A csíranövény phloem exudátuma megfelel azoknak a kritériumoknak, melyek igazolják, hogy valamennyi komponense a rostacsövek transzlokációs áramából ered, nem pedig a környező szövet sérüléséből származik.

A ricinus csíranövény egyrészt ezért alkalmas és közkedvelt modell objektum a phloem fiziológiai vizsgálatok számára, másrészt a csíranövény (6 napos) endospermiumba ágyazott sziklevelének epidermiszét nem borítja kutikula, az endospermiumot eltávolítva képes különféle szubsztrátok felvételére, így tanulmányozható az anyagok bejutása a phloembe, a phloem elemek elektrofiziológiai reakciói, az exudátumban vizsgálható a sziklevelén keresztül a phloembe jutott anyagok megjelenése.

A ricinus csíranövény phloem exudátuma mobilis fehérjét tartalmaz, azonban ezek fiziológiai szerepe, jelentősége ismeretlen.

Kísérleteink célja az volt, hogy ezt a fehérjetartalmat különféle gélelektroforetikus eljárásokkal komponenseire szétválasszuk, kidolgozzuk a kétdimenziós (2D) elválasztásuk technikai részleteit, ennek segítségével meghatározzuk a fehérjekomponensek számát, pI értékét és molekulásúlyát.

A 2D elválasztás segítségével az egyedi fehérjekomponensek további analízise lehetséges (poliklonális ellenanyag előállítás, N-terminális aminosav-szekvencia meghatározása stb.). Kísérleteink további célja volt, hogy a laboratóriumunkban rendelkezésre álló módszerek (ld. *Kísérleti anyagok és módszerek* c. fejezet) felhasználásával funkcionálisan azonosítsunk néhány fehérjét, ami az első lépést jelentené a phloem mobilis fehérjéinek élettani szerepének felderítésében.

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A növényi anyag

Kísérleteinkben a ricinus két tenyésztésformájának, - *Ricinus communis* L. cv Carmencita és *R. communis* L. cv sanguineus -, steril körülmények között, hidroponikusan nevelt 6 napos csíranövényeit ill. üvegházban nevelt kifejlett, virágzó vagy a termésképzés korai fázisában levő példányait használtuk (1).

Phloemexudáció: rostacső nedv gyűjtése csíranövényből

A 6 napos csíranövény hypocotyljának elvékonyodó szakaszát, közvetlenül a kampónál, 1-3 cm-re az endospermium mögött éles zsilippengével keresztülmetsztük. Az így kapott hajtás-szegmentet, mely az endospermiummal fedett sziklevelekből és a hypocotyl kis darabjából áll, az endospermiummal lefelé 10 ml-es főzőpohárba helyeztük, melyet előzőleg desztillált vízzel nedvesített Vermiculittal töltöttünk meg. Az exudációt fokozza, ha az első metszést követően 10 percen belül újabb metszést ejtünk a hypocotylon, 3-5 mm-re az előzőtől. Az így előkészített csíranövény-szegmentet plexitetővel fedett vízfürdőben inkubáltuk, ami biztosította a magas relatív páratartalmat, és az állandó hőmérsékletet. A metszési felületen megjelenő rostacső exudátumot 10 és 50 µl-es üveg mikropillárisokat használva gyűjtöttük össze (1).

Rostacsőnedv gyűjtése kifejlett növényből

Erre a célra virágzó, ill. a termésérlelés korai fázisában levő egyedeket használtunk. A virágzati tengelyt keresztülmetszve 50 µl-es mikropillárisokkal gyűjtöttünk phloem exudátumot. Az exudáció csökkenésekor a metszést 1-2 mm-re az előző mögött megismételtük. Az gyűjtött exudátumot lefagyaszva tároltuk, -20 °C-on.

Az exudátum fehérjetartalmának koncentrációja

A csíranövényekből nyerhető rostacső exudátum fehérjetartalma 1 mg/ml alatti alacsony érték. A vizsgálatok egy részéhez kis oldattérfogat mellett magas fehérjetartalom szükséges, azonban az exudátum egyéb komponenseinek koncentrációját növelni nem kívánatos. Centricon-3 jelű mikrokonzentrátor csövek (Amicon) alkalmasak a fehérje tartalom tízszeres növelésére, az egyéb, 3 kD-nál kisebb molekulású komponensek koncentrációjának változatlanul hagyása mellett.

A fehérjék mindegyikének nagyobb a molekulásúlya 3 kD-nál, ezért egyetlen komponens sem tűnik el a koncentráció során.

Fehérjekivonás növényi szövetekből

A phloem exudátum fehérjéinek összehasonlító vizsgálata kapcsán szükséges volt a csíranövény különböző részeiből (gyökérből, a hypocotyl alsó és felső részéből, a sziklevelekből) származó fehérje kivonat előállítását. Az lemért tömegű növényi szövetdarabot folyékony N₂-nel megfagyasztottuk, előhűtött dörzscsészében porrá törtük. Extrakciós puffert adtunk hozzá Eppendorf-csőben, majd felolvadni hagytuk. Intenzív keverés (vortex) után Eppendorf-centrifugával üleptettük. A kivonat fehérjetartalmát meghatároztuk, -20 °C-on tároltuk (1).

A fehérjekoncentráció meghatározása

Erre a célra a Bradford-módszeren alapuló Bio-Rad Micro Protein Assay-t használtuk (1), mely a 0-25 µg/ml tartományban alkalmas a fehérje koncentráció gyors fotometriás meghatározására.

Elektroforetikus eljárások

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjék denaturáló jellegű, molekulásúly szerinti elválasztását Schägger & von Jagow eljárása alapján végeztük (1), mely alkalmas a 1-100 kD, de különösen az 5-30 kD molekulásúlyú fehérjék szeparálására. Az elektroforézishez Mini-Protean II Dual Slab (Bio-Rad) függőleges elrendezésű cellát, és EPS 500/400 (Pharmacia LKB) tápegységet használtunk. A 80 x 70 x 0,75 mm formátumú gélek 10mm hosszúságú 4%(T)-os stacking gélt tartalmaztak a 10%(T)-os szeparáló gél fölött.

Natív izoelektromos fókuszálás (IEF)

Az natív izoelektromos fókuszálás (IEF) a fehérjék izoelektromos pontjának (pI) meghatározására szolgál, urea hozzáadása nélkül. A gélben carrier ampholyte-okkal, ill. a kívánt pH tartományt közrefogó katód-, és anód-puffer alkalmazásával létrehozható és stabilizálható a pH-grádiens. A *carrier ampholyte*-ok a gélstruktúrában nem kovalensen rögzítettek, így a pH-grádiens stabilitása nem éri el az *Immobiline*-grádiensekét, azonban használatuk egyszerű, a pH-grádiens a futtatás megkezdésekor spontán kialakul. A futtatás végpontját (itt az áramerősség 0-hoz közelít) túllépve a



pH-grádiens eltorzulhat (*cathodic drift*, az ampholyte molekulák gélbeli elmozdulása miatt). A géltre lehetséges két alkalommal fehérjemintát felvinni: a futás megkezdése után 20 perc elteltével a zseb tartalma kicserélhető, ílymódon a gél fehérjetartalma megkétszerezhető.

Kísérleteinkben 5%(T)-os, 80 x 70 x 0,75 mm formátumú géleket, Servalyt ampholyte-ot, Bio-Rad Mini-Protean II Dual Slab vertikális elrendezés- cellát és EPS 500/400 (Pharmacia LKB) tápegységet használtunk (1).

Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D)

L. *Módszertani eredmények c. fejezetet.*

Fehérjék elektroforetikus transzfere NC, PVDF membránra

Valamennyi géltípusból a fehérjék átvihetők NC (nitrocellulóz) vagy PVDF (polivinilidén-difluorid) membrán felületére. A transzfert (*semidry blotting*) a Multiphor II rendszerhez kapcsolható NovaBlot egységgel végeztük. Transzfer-pufferként borát puffert (pH 9,0) használtunk, mely az anód oldalon 10%, a katód oldalon 5% metanolt tartalmazott. A gélt transzfer-pufferben áztattuk, ezután helyeztük el a pufferrel szintén telített transzfer-szendvicsben. Az elektroforetikus transzfert 1 mA/cm² áramerősséggel végeztük, 60-90 percig, a transzfert kovalensen festett marker fehérjékkel ellenőriztük, ill. a *blot* megfestésével (1).

Western-blot

Specifikus antitestekkel egyedi fehérjék azonosíthatók a PVDF, vagy NC membránra átvitt fehérjék között. Az eljárás lényege, hogy első lépésben a primer antitesttel a keresett fehérjét jelöljük meg, majd pedig a megkötött primer antitestet egy IgG specifikus, enzimmel kapcsolt szekunder antitesttel. Ílymódon a keresett fehérje végül is színreakcióval azonosítható. Az eljárás: i) elektroforetikus transzferrel a fehérjéket a gélből NC, vagy PVDF membránra vittük át; ii) a membrán maradék fehérjekötő kapacitását telítettük blokkoló-oldattal; iii) friss blokkoló-oldatban hozzáadtuk a primer antitestet (fehérjespecifikus poliklonális nyúl antitest; iv) blokkoló-oldattal mostuk a membránt, majd hozzáadtuk a szekunder antitestet (pl. Sigma Goat Anti-Rabbit IgG) (peroxidáz vagy alkalikus foszfatáz konjugátumot); v) pufferrel öblítettük, majd Na-acetátban inkubáltuk; vi) elvégeztük a színreakciót (1).

Poliklonális antitestek előállítása

Tisztított exudátum fehérjék ellen poliklonális antitesteket tartalmazó szérumot állítottunk elő nyúlban. Diano módszerét adaptáltuk (1). A módosított eljárás előnyei, hogy kíméletes a nyúl számára, mivel nem használtunk Freund-adjuvánst az immunizálás során, ill. kismennyiségű fehérje is elegendő az antitest termelés kiváltásához.

A kiválasztott fehérjét 2D elektroforézissel tisztítottuk, NC membránra (Millipore) transzferáltuk (immobilizáltuk). A megfestett foltokat a membránból kivágtuk. A kb. 10 µg fehérjét tartalmazó NC darabkákat 1 ml pufferben többször megfagyasztottuk és felolvasztottuk, majd ultrahanggal (60-100 W) finom szuszpenzióvá porítottuk. A szuszpenziót két részre osztva a nyúl hátbőre alá injektáltuk mindkét oldalon. A véreztetés a fül centrális artériáján keresztül történt, 8-15 ml vér alkalmanként. A vért állni hagytuk szobahőmérsékleten 1 órán át, majd a szérumot centrifugálással különítettük el. A szérumot Eppendorf-csövekbe szétosztva, ill. liofilizált formában tároltuk -20 °C-on.

Radioaktivitás detektálása

Autoradiográfia

A radioaktiv jelölést hordozó fehérjéket gélelektroforézissel elválasztottuk, és NC vagy PVDF membránra blottoltuk. A kazettában rögzítettük, és Kodak X-OMAT AR filmet helyeztünk rá. Dupont Cronex Lightning Plus JI intenzitásnövelő lemezzel növeltük az érzékenységet.

A radioaktivitás mérése

A minták radioaktivitását szcintillációs mérőműszerrel (Tri-Carb Packard 2500TR Liquid Scintillation Analyzer) szcintillációs folyadékban (Rotiszint 2211) mértük. A folyadékmintát közvetlenül a szcintillációs koktélba adagoltuk. A fehérjéhez kötött radioaktivitás meghatározásakor a fehérjéket szűrőpapír korongra precipitáltuk, és szárítás után szcintillációs koktélban mértük.

Protein-kináz aktivitás detektálása

A protein-kinázok az ATP terminális foszfátjának transzferét katalizálják számos fehérje szerin, treonin, vagy tirozin aminosavára. A fehérjefoszforilációt a [γ -

^{32}P]ATP-ből származó ^{32}P beépülésének mérésével mutattuk ki, magnézium jelenlétében. A foszforilált fehérjéket a jelölt prekuzortól a fent leírt filter-precipitációs eljárással, ill. gélelektroforézissel különítettük el, a ^{32}P jelölést szcintillációs méréssel, ill. autoradiográfiásan detektáltuk. A protein-kináz reakció szubsztrátjaként defoszforilált, parciálisan hidrolizált kazeint (Sigma) használtunk, ill. kontroll enzimként Sigma protein-kináz katalitikus alegységet (1).

Ca-kötő fehérjék kimutatása *Stains-all* festéssel

Ca-kötő fehérjék, calsequestrin, calmodulin, troponin C, kékre festődnek, ha egy kationos karbocianin festékkel, *Stains-all*-al festjük meg az SDS-gélt.

A fehérjéket tartalmazó SDS-minigélt izo-propanolban egy éjszakán át fixáltuk, majd izo-propanollal alaposan mostuk, hogy eltávolítsuk az SDS-t a gélből. A gélek festését *Stains-all*-al 48 órán át, sötétben végeztük. A háttérrel izo-propanollal színtelenítettük (1).

N-terminális aminosav szekvencia meghatározása

A vizsgált fehérjét 2D elektroforézissel preparáltuk és PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore) transzféráltuk, Coomassie Brilliant Blue G-250-nel festettük. A szekvenálást az Applied Biosystems Inc. Model 437A szekvenátorában végeztük, 6-8 ciklust.

^{35}S]-L-metionin felvétele

A radioaktív metionin a többi aminosavhoz hasonlóan felvehető a 6 napos ricinus csíranövények számára a sziklevelén át. Az ^{35}S]-metioninnal a szintetizálódó fehérjék megjelölhetőek. Az intakt 6 napos ricinus csíranövények sziklevelét 1 órán át szacharózt, L-glutamint, K_2HPO_4 , ^{35}S]-L-metionint tartalmazó oldatban inkubáltuk, majd phloem exudátumot gyűjtöttünk. Ezt SDS-minigélben futtattuk, a jelölt fehérjéket autoradiográfiával tettük láthatóvá (1, 2).

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA (TÉZISEK)

A rostacsó exudátum fehérjét tartalmaz

(*STEPS: sieve tube exudate proteins*)

Az exudáció sebessége

A 6 napos csíranövények a kétszeri metszést követően kb. 4 órán át folyamatosan exudáltak. Az exudáció átlagos sebessége $20(\pm 5)$ $\mu\text{l/h}$ volt. Az exudáció az első 10 percben gyorsabb volt (kb. $30 \mu\text{l/h}$), majd az átlagérték körül stabilizálódott, kb. két órán át változatlan volt, vagy lassan csökkent $16(\pm 2)$ $\mu\text{l/h}$ értékre. A 4. óra körül az exudáció sebessége meredeken csökkent és leállt.

A felnőtt növények exudációjának sebessége általában meghaladta a csíranövényekét, azonban a nagyfokú egyedi variabilitás miatt ez átlagértékkel nem jellemezhető. Az exudáció gyorsan leállt (10-30 perc), fenntartásához többször ismételt metszés volt szükséges.

A csíranövények exudátuma víztiszta, átlátszó. A levegő oxigénjének hatására gélesedés, ill. precipitáció nem volt tapasztalható. A *Cucurbitaceae* exudátumok mindegyike a levegőn hálózatot formál, mely része egy védekező mechanizmusnak. Az exudátum pH értéke 7,55 volt (1, 2).

A rostacsó exudátum fehérjetartalma

A fehérjék folyamatosan jelen vannak a tiszta rostacsó exudátumban. A 0,5 mM CaCl_2 oldatban nevelt 6 napos ricinus csíranövények exudátumában a fehérje koncentráció $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ körüli érték volt, mely az exudáció során állandó volt. A Vermiculiton nevelt csíranövények exudátumában a fehérjekoncentráció magasabb volt, $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, ez azonban kisebb exudációs sebességgel párosult, $11(\pm 5)$ $\mu\text{l/h}$. Így az óránként exudált fehérjemennyiség megközelítően azonos volt, kb. $3 \mu\text{g/h}$. A bemetszést követően az exudátum első $5 \mu\text{l}$ -ében a fehérjekoncentráció a roncsolt sejtekből származó fehérje szennyezés miatt magasabb volt, $0,3-0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Az első $2 \mu\text{l}$ exudátum eltávolítása elegendő, de az általunk alkalmazott $8 \mu\text{l}$ két részletben történt eltávolítása feltétlenül biztosította, hogy az exudátum szennyező fehérjéktől mentes legyen. Az exudátum fehérjetartalma a nem *Cucurbitaceae* családba tartozó fajokéval azonos nagyságrendbe esik: *Oryza*, $0,15-0,20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; *Tilia*, $0,31 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, *Triticum*, $0,10-$

0,41 µg/µl. Azonban nagyon különbözik a *Cucurbita*, 10-15 µg/µl phloem exudátumok jellemzően magas fehérjetartalmától (1, 2).

A rostacsó exudátum fehérjéi molekulásúly szerint elválaszthatók: SDS-PAGE

A fehérjék molekulásúlya

A rostacsó exudátum fehérjetartalma molekulásúly szerint kb. 26 megkülönböztethető sávra vált szét a Schagger & v. Jagow szerint készített minigélben. Valamennyi komponens belefutott a szeparáló gélbe, a zsebek alján, ill. a stacking gélben fehérjék nem maradtak. A fehérjék a 10-100 kD tartományban jellegzetes elrendeződést mutatnak. A sávok fehérjetartalma eltérő, a 18-20 kD régióban három nagy denzitású sáv látható. Az összes többi sáv denzitása ezeknél a fő sávokénál kisebb. A fehérjesáv-mintázat három részre bontható: i) az alsó régió, mely 6 sávot tartalmaz; ii) a centrális régió, mely a 3 fő sávból áll; iii) a felső régió, melyben 17 változatos denzitású sáv található. A *R. communis* L. rostacsó exudátum fehérjetartalma jellemzően kis molekulásúlyú (10-80 kD) komponensekből áll, a többség 30kD-nál kisebb, a minor komponensnek tekintett legnagyobb molekulásúlyú fehérjék sem haladják meg a 80 kD-t. A fehérjemintázat vizsgálata során nem találtunk P-protein filamentumokat ill. aggregátumokat, melyek a *Cucurbitaceae* család exudátumának jelentős hányadát alkotják (1, 2).

A rostacsó exudátum fehérjemintázata állandó az exudáció során: i) mindegyik fehérje összetevő folyamatosan jelen van a phloem nedvben, nem látszanak szennyezésből származó, és az exudáció előrehaladtával felhíguló komponensek; ii) a sebzés által indukált de novo fehérjeszintézisből eredő új sávok nem láthatók. A sebzési exudátum magasabb fehérjetartalma, mely a sérült parenchyma sejtekből származik, a felső régió finom sávozottságában jelenik meg, a nagyszámú minor komponens molekulásúlya 20 kD-nál nagyobb. Az alsó régióban nem figyelhető meg szennyező fehérjék. Az exudátum jellegzetes sávjai ezekben a mintákban is jól felismerhetők (1, 2).

A 4 órán át szobahőmérsékleten inkubált exudátum fehérjemintázata változatlan: i) nem jelentek meg új sávok a magasabb molekulásúlyú régióban, azaz az exudátumban nem következett be gélesedés, ill. a fehérjemolekulák aggregálódása, kovalens kapcsolódása; ii) nem tűntek el nagy molekulásúlyú sávok, és nem jelentek

meg újabbak az alacsonyabb molekulásúlyú részben, azaz proteázaktivitás a natív rostacső exudátumban nem észlelhető. Ennek az oka az, hogy a phloem exudátum proteáz inhibitorot tartalmaz: egy cisztein típusú proteázokat gátló proteint, a *cisztatint*.

Szulfhidril-reagens változást okoz az SDS-PAGE fehérjemintázatban

A szulfhidril-reagensek, így a β -merkaptoetanol (ME), a polipeptidláncokat összekötő diszulfid-hidakat felbontják. Az intermolekuláris cisztein-hidak felhasadása ME hatására, szabaddá teszi a fehérjealegységeket, a gélben nagy molekulásúlyú sáv(ok) tűnik el, egyidejűleg egy vagy több alacsonyabb molekulásúlyú sáv jelenik meg. Az intramolekuláris diszulfid-híd felbomlása esetén a fehérjesáv a magasabb molekulásúly irányába tolódik el.

Megvizsgáltuk az SDS-PAGE fehérjesávmintázat változását β -merkaptoetanol (ME) hatására. ME nélkül a 18, 19 kD-os két főszáv látható, mely ME jelenlétében a jellegzetes 3 főszávra válik szét, a 19 kD-os sáv egy része (ez a denzitás csökkenéséből jól látszik) a 20 kD-os sávba vándorol. A helyén maradó 19 kD-os komponens valószínűleg nem azonos a 20 kD-os fehérjével, feltételezve, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között valamennyi diszulfid-híd felbontható. A fehérjék kétdimenziós elválasztása a későbbiekben magyarázatot ad az elsősorban a fehérjesávok inhomogenitásából adódó kérdésekre (1, 2).

A fehérjemintázatban nem találtunk több olyan sávot melynek helyzete megváltozott volna ME hatására. Az is megállapítható, hogy a natív rostacső exudátumban nincsenek diszulfid-hidakkal stabilizált nagy molekulásúlyú aggregátumok, melyeknek molekulásúlya meghaladná a 100 kD-t.

Phloemspecifitás

A rostacső exudátum fehérjeinek SDS-PAGE elválasztásával demonstrálható, hogy az exudátum fehérjemintázata nem azonos a csíranövény különböző szerveiből nyert fehérje extraktumok fehérjemintázatával. Ha a rostacső exudátum fehérjét összehasonlítjuk azonos mennyiségű, a hypocotylból, ill. a szikleveleiből nyert extraktumok fehérjemintázatával, látható, hogy a szövetkivonatok fehérjéi a 30 kD-nál nagyobb molekulásúly tartományban vannak, míg az exudátumban a kisebb molekulásúlyú fehérjék dominálnak. Azonos fehérje mennyiséget tekintve a szövetkivonatokban nem található az exudátuméhoz hasonló nagy denzitású (erős festődésű) sávok.

A szövetkivonatok megnövelt fehérjemennyiséggel létrehozott sávmintázatának az exudátum mintázatával való összehasonlítása azt mutatja, hogy a rostacső exudátum fehérjetartalmának molekulásúly szerinti megoszlása, és az egyes sávok fehérjetartalma (denzitása) különbözik mindegyik szövetkivonattól, a fehérjemintázat phloem-specifikusnak tekinthető. Azonban az, hogy az egyes fehérjék kizárólag a phloemben fordulnak elő nem dönthető el, mivel a megnövelt fehérjetartalmú mintákban, pl. a sziklevelben, és a hypocotylban feltűnnek olyan fehérjesávok, melyek az exudátum egyes sávjaival azonos magasságban helyezkednek el (1, 2).

A rostacső exudátum fehérjei pI értékük szerint elválaszthatók: IEF

Az IEF során alkalmazott pH gradiens elég stabil volt ahhoz, hogy a fehérjék elérjék a pI értéküknek megfelelő equilibrium pH-t. A pH gradiens a pH 3-9 tartományban értékelhető felbontású volt, a pH 4-6 értékek között különösen jó elválást adott. A *R. communis* L. cv Carmencita 6 napos csíranövények rostacső exudátumának fehérjetartalmát 34 különböző pI értékű fehérjesávra sikerült felbontani. A sávok zöme a pI 4,6-5,9 (gyengén savas) régióban helyezkedik el, de található sáv a pI 3,7, ill. a pI 9 értékeknél is.

Az IEF mintázatban 6 különösen intenzív festődésű sáv látható pI 5, pI 5,9 és pI 9 körüli értékeknél. A sávok túlnyomó része közepes, vagy gyenge festődésű. Nagyobb fehérjemennyiség (20-40 µg) volt szükséges ahhoz, hogy a sávmintázat értékelhető legyen, valószínű, hogy a sávok száma több mint 34. A nagy denzitású sávok nem feltétlenül azonosak az SDS-PAGE mintázat fősvájjaival, ez a kétdimenziós elválasztásból eldönthető (1, 2).

Összehasonlító vizsgálatok

Megvizsgáltuk a két *Ricinus* tenyészcsoport 6 napos csíranövényéből és kifejllett növényéből származó rostacső exudátumok SDS-PAGE, IEF sávmintázatát. Az összehasonlító vizsgálatok célja az volt, hogy megállapítsuk azt, hogy: i) változik-e az exudátum fehérjemintázata az egyedfejlődés során; ii) a genetikailag különböző tenyészcsoportok (*R. communis* L. cv Carmencita, ill. cv sanguineus) exudátumának fehérjemintázata milyen különbségeket mutat.

Az egyedfejlődéssel vátozik a fehérjemintázat

Az egyedfejlődés két egymástól időben távoli stádiumában levő egyedekből nyert rostacső exudátumok SDS-PAGE mintázata azt mutatja, hogy a csíranövények és a kifejlett növények exudátuma azonos sávokra bontható fel, azonban az egyes sávok denzitása eltér. Úgy tűnik, az egyedfejlődés során bizonyos fehérjék mennyisége megnő, másoké csökken: az alsó régió 5. sávjának fehérjetartalma megnőtt, a fősvok a centrális régióban vesztek fehérjetartalmukból a felnőtt növényekben. Az IEF mintázat változása hasonlóképpen jellemezhető: azonos a sávok helyzete, azonban a denzitás (fehérjetartalom) különbözhet: a pI 5 értékhez közel eső sávok. Ebből arra lehet következtetni, hogy a phloem exudátum egyedi fehérjéi meghatározott, azonban eddig felderítetlen élettani feladatot látnak el, mely az egyedfejlődés során változhat (1, 4, 9).

Tenyészváltozatok exudátumának SDS-PAGE, IEF sávmintázata

A két tenyészváltozat (Carmencita és sanguineus) habitusa jelentősen eltér. Megvizsgálva a csíranövények rostacső exudátumának SDS-PAGE sávmintázatát a két minta gyakorlatilag azonos sávelrendeződést mutat, a felső régió minor komponensei között fedezhetőek fel csekély eltérések, a felső régió 17 jellegzetes sávja azonosítható. Az IEF mintázat jól tükrözi a genetikai különbségeket, eltérései szembeutőbbek. A pI 6 érték közelében új sávok láthatók a *sanguineus* exudátumában (1).

A rostacső exudátum 115 egyedi fehérjét tartalmaz: 2D-PAGE

A módszertani eredményekhez sorolható, hogy kidolgoztuk egy olyan kétdimenziós elektroforetikus elválasztás technikai részleteit (futtatási paraméterek, gélequibrálás a 2. dimenziót megelőzően), mely első dimenzióként egy *carrier ampholyte* típusú izoelektromos fókuszálást (IEF), második dimenzióként a Schagger & v. Jagow szerinti SDS-poliakrilamid-gélelektroforézist (SDS-PAGE) foglal magába. Az eljárás jellemzői: i) nagymértékben reprodukálható; ii) megfelelő felbontást ad, nagy valószínűséggel egyedi fehérjékre bontja fel az exudátum fehérjetartalmát (1).

Kétdimenziós poliakrilamid gél elektroforézis (2D)

A kétdimenziós elektroforézis technika alkalmas a komplex fehérje elegyek komponenseinek szétválasztására. Az első dimenzióként alkalmazott izoelektromos fókuszálás (IEF) a fehérjéket eltérő pI értékük alapján sávokba rendezi. Egy-egy ilyen sáv a gélen rendszerint több fehérjekomponenst tartalmaz. A második dimenzió SDS-

poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE), ami a molekulásúly alapján nagy valószínűséggel egyedi fehérje pontokká bontja az IEF sávjait. Ily módon akár 1000 polipeptid komponens is elválasztható.

Az IEF a fent leírt módon történt. A második dimenzió Schägger & v. Jagow szerinti SDS-PAGE (10%T) volt a fenti összetételben, azonban a futtatáshoz 125 x 260 x 0,5 mm gél-formátumú horizontális elrendezésű Multiphor II (Pharmacia) rendszert használtunk, EPS 500/400 (Pharmacia LKB) tápegységgel.

A vékony gélt (0,5 mm) GelBond PAG film (Pharmacia) felületére polimerizáltuk, a hidrophil oldalra, ha a megfestett géltre volt szükség, a hidrophób oldalt használtuk egyéb preparatív feladatokhoz (blot), ahonnan a gél könnyen leválasztható volt. A horizontális gélek 35 mm stacking gélt, és 80 mm hosszúságú szeparáló gélt tartalmaztak.

Mintaelőkészítés a 2. dimenzióhoz

Az 1. dimenzióban (IEF) elválasztott fehérjéket nem eluáltuk a gélből, hanem gélben megtartva őket, a gélseletet equilibráltuk SDS tartalmú pufferrel. Equilibráló oldat: 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 2% β -merkaptoetanol, 11% glicerin. A gélseletet szobahőmérsékleten kb. 10 ml oldatban 2x10 percig equilibráltuk, félidőben az oldat felét frissre cseréltük. Az így előkészített gélseletet a horizontális SDS géltre helyeztük úgy, hogy kb. 10-15 mm szabad stacking rész maradjon előtte.

A molekulásúly standardot oldatként vittük fel a géltre helyezett Whatman 3MM papírszeletre.

Elektroforézis-paraméterek

A 2. dimenziós géleket Multiphor II tankban, szobahőmérsékleten, de hűtőlapon futtattuk. A gélt az elektród-pufferekkel Whatman 3MM papír-hidakkal kötöttük össze. Amíg a Coomassie Brilliant Blue G-250-nel jelölt front el nem érte a szeparáló gél határát (kb. 70 perc) a maximált feszültség 200 V (17 mA) volt. A szeparáló gélben a futás: max. 30 mA (500 V). A futás időtartama kb. 4 óra.

A rostacső exudátum fehérjetartalmának 2D elválasztása

A *R. communis* L. cv Carmencita 6 napos csíranövényeinek rostacső exudátuma 115 fehérjepontra volt felbontható. Megfigyelhető, hogy az SDS-PAGE fősvájai nagyszámú egyedi fehérjére bomlottak, a sávok zöme valóban inhomogén volt az egydimenziós géleken. A fehérjék molekulásúlyát és pI értékét meghatároztuk,

ez a számozás szolgál a későbbi vizsgálatokban az egyes fehérjék megnevezésére, azonosítására (STEP 1-115). A fehérjemintázat jellegzetessége, hogy a komponensek nagy része a pI 4,6-5,9 tartományba esik, ill. az azonos molekulásúlyú egyedi fehérjék eltérő izoelektromos pont szerint erősen szóródnak. A *R. communis* L. phloem exudátum kétdimenziós fehérjemintázata rendkívüli hasonlóságot mutat a búza phloem exudátum fehérjék kétdimenziós eloszlásával. A búza phloem exudátuma több mint 100, többségében 30 kD alatti molekulásúlyú fehérjét tartalmaz. A két távoli faj rostacsó exudátum-fehérjéinek rendkívül nagyfokú hasonlósága azt mutathatja, hogy a magasabbrendű növények mobilis fehérjéinek előfordulása általános, és élettani szerep tulajdonítható ennek a fehérjefrakciónak (1, 2).

Az STEPs korlátozott mennyisége ellenére sikerült a 2D elválasztást megoldani, az egyedi fehérjekomponenseket szeparálni. Ez alapvető jelentőségű a későbbi kísérletekhez.

A [³⁵S]-L-metionin beépül a STEPs-be

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a rostacsó nedv folyamatosan jelen levő fehérjéi vajon egy raktározott fehérje-pool lebontásából származnak-e, vagy a fehérjék állandóan szintetizálódnak.

A csíranövény képes aminosavakat felvenni a sziklevélen keresztül, ha előzőleg a zárt endospermiumot eltávolítottuk. [³⁵S]-metioninnal a frissen szintetizálódó fehérjék in vivo megjelölhetők. Az SDS-PAGE autoradiográfián látható, hogy a radioaktív metioninnal történt 1 órás inkubációt követően az exudáció első 30 percében gyűjtött rostacsó nedv már tartalmaz jelölést, azaz de novo szintetizált fehérjéket. A 20 kD-os fősáv különösen intenzíven jelölt, a 19 kD-os fősáv is látható. A későbbiek során, a következő 50 percben, és ez exudáció 3. órájában gyűjtött exudátumban a sávmintázat egyre több fehérjéje vált jelöltté, különösen a magasabb molekulásúlyú sávokban. A 18 kD-nál nem észlelhető jelölés, ott, ahol Coomassie-festéssel az egyik fősáv található. Ez magyarázható azzal, hogy a fehérje lassan szintetizálódik, vagy nem tartalmaz metionint.

A hypocotyl és sziklevek fehérjéi eltérő jelölési mintázatot mutatnak. A sziklevek fehérje-kivonatában talált sok radioaktív sáv intenzív fehérjeszintézist mutat, a hypocotyl fehérje extraktuma alig tartalmazott radioaktivitást az exudáció 4. órájában.

Az eredményekből megállapítható, hogy a rostacső exudátum fehérjéinek többsége folyamatosan szintetizálódik. Az exudátum fehérjék szintézisének ismeretében kizárható az a fehérjék eredetére vonatkozó feltevés, hogy a növényben lejátszódó élettani folyamatok változásával, más-más "hulladék" képződik, azaz más-más exudátum fehérjekomponensek jelennek meg, kizárható továbbá, hogy a phloem mobilis fehérjei egy raktározott fehérje-pool (pl. *protein body*) lebomlásából származnak (1, 2).

Poliklonális antitesteket tartalmazó szérum előállítása a STEP 29 jelű exudátum fehérje ellen

A fehérjék 2D elválasztása lehetővé tette az exudátum egyedi fehérje komponenseinek preparatív tisztítását. A STEP 29 jelű az egyik "legnagyobb" mennyiségben előforduló fehérjekomponens a rostacső exudátumban; az egydimenziós SDS-PAGE mintázat középső fősávjának része.

Az NC membránra immobilizált fehérjével végzett immunizálás sikeres volt. A nyúlból nyert szérum 1:100 hígításban jó eredményt adott. A STEP 29 fehérje elleni poliklonális szérum az exudátum két sávjával reagált: a 19 kD os sávban, melynek része a STEP 29 és a 70 kD sávban. A sziklevel és a hypocotyl fehérje extraktumában a 19 kD-os sávban látszik specifikus jelölődés. A *blot*-on megjelent többi halvány sáv nincs összefüggésben a STEP 29 fehérjével, mivel ezek a sávok a preimmun szérummal is láthatók voltak (1).

Az előállított poliklonális antitesteket tartalmazó szérum felhasználható más kutatók által vizsgált növényfajok phloem exudátumában immunológiailag hasonló fehérjék kimutatására.

Exudátum fehérjék immunológiai hasonlóság alapján azonosíthatók: Western-blot

Különbéle, ismert fehérjével specifikusan reagáló poliklonális antitesteket tartalmazó szérummal kerestünk pozitív reakciót adó fehérje komponenseket a rostacső exudátum SDS-PAGE mintázatában. Olyan fehérjéket választottunk ki, amelyek rendkívül konzervatív szerkezetűek, és az élőlények széles körében megtalálhatók.

Ubiquitin

Mivel a rostacső elemekben az érésük során jelentős mértékű proteolízis zajlik le, megvizsgáltuk, vajon jelen vannak-e az exudátumban az ubiquitin-függő protein

lebontó rendszer komponensei: pl. az ubiquitin, az ubiquitin-konjugáló enzimek, proteasome. Az ubiquitin-antitest különösen erős jelet adott a phloem exudatum polipeptidjeivel. A jelölt fehérje molekulásúlya 10 kD, ami megfelel a tiszta, monomer ubiquitin molekulásúlyának. A jelölés az SDS-PAGE mintázat alsó régiójának 1. sávjában van, ami a 2D mintázat alapján megállapíthatóan egyetlen fehérjekomponensből áll, a 2D mintázat STEP 1 jelű fehérjéje ubiquitinként azonosítható (a STEP 1 pI értéke is megfelel az ubiquitinének: $pI > 7,83$). Az ubiquitin a többi fehérjéhez viszonyítva jelentős mennyiségben fordul elő az exudátumban szabad monomerként, az összes STEP kb. 10%-a. Az exudátumban 20 kD molekulásúlyú komponens reagált az *Ubi*-antitesttel, ez valószínűleg ubiquitinált fehérje. Az UBC4 és proteasome szérum nem adott pozitív eredményt a phloem fehérjékkel. Ez azt mutatja, hogy a rosta-elemekben az ubiquitin függő fehérjelebontás nem működőképes (1, 4, 9, 10).

Chaperonok: HSP 70, GroEL, RBP

A *R. communis* L. rostacső exudátumában poliklonális antitestekkel kimutatunk három fehérjét, melyek a chaperonok csoportjába tartoznak.

A HSP 70 fehérje-család képviselői normál körülmények között is megtalálhatók a növényekben, megjelenésük független lehet stressztől, azonban az egyes HSP-k előfordulása szövetspecifikus lehet, vagy a sejt bizonyos fejlődési állapotához kötődhet. A prokaryota GroEL elleni antitest az eukaryoták HSP 60 fehérjéivel ad keresztreakciót. Ezek a chaperonok (HSP 70, HSP 60) megkönnyíthetik a fehérjetranszportot, a fehérjék membránon, plazmodezmákon való átjutását (az alacsony SEL ellenére). Ezek a fehérjék képesek más fehérjék konformációját ideiglenesen megváltoztatni, *unfolding-folding* reakciót katalizálni, fenntartani a fehérje *unfolded* állapotát mindaddig amíg a fehérjetranszlokáció végbemegy a membrán két oldala között.

A phloem exudátumban, hasonlóan a szikleveleiből és hypocotylból származó fehérjekivonatokhoz pozitív reakciót találtunk HSP 70-antitesttel, minden esetben 70 kD-nál. A GroEL szérum 90 kD-nál adott erősebb jelet, azonban 60 kD-nál is megjelent egy halvány szignál. Az RBP-antitest (*Rubisco binding protein*) tiszta, erős jelélést adott a várható 60 kD-nál (1, 3, 8, 10).

A rostacsó exudátum Ca-kötő fehérjét tartalmaz

Stains-all festéssel megfelelő kísérleti körülmények között specifikusan kékre festődnek a Ca-kötő fehérjék. Az SDS-PAGE minigél fehérjemintázatában pozitív festődést találtunk. A 18 kD-os (alsó) fősávban az egyik fehérje komponens kékre festődött. A sáv molekulásúlya szerint a calmodulinnak felel meg. A 2D mintázatban azonosítható olyan fehérje (STEP 27), amely molekulásúlya (M_r :18,35 kD) és izoelektromos pontja (pI 3,87) alapján megfelel a calmodulinnak. A calmodulin-anti-testtel végzett Western-blot ezt megerősítette (1).

Protein-kináz aktivitás detektálható az exudátumban

Vannak előzetes eredményeink ^{33}P -foszfát *in vivo* beépüléséről az exudátum fehérjéibe. A fehérjék egy része valószínűleg foszforilált, ami egy lehetséges magyarázata lehet a 2D mintázat számos azonos molekulásúlyú fehérjéjének pI szerinti erős szóródásának.

Azonban a ^{33}P -foszfát felvételét követően az exudáció olyan csekély volt (<30 μl), hogy az ebből futtatott 2D autoradiogramján (1 hónap expozíció) csak alig voltak észlelhetők a foltok, és valószínű, ez csak egy része volt a ténylegesen jelölt fehérjéknek. A ^{33}P -beépülés a 18-20 kD-os sávok régiójában volt. A fehérjetartalom-ban kötött radioaktivitás mért értéke alig haladta meg a háttérét, a fehérjékre becsült alacsony specifikus aktivitás, és a ^{33}P -nak a ^{32}P -nál amúgy is kisebb energiájú sugárzása miatt.

Natív rostacsó exudátumban sikerült protein-kináz aktivitást detektálni. Az exudátum a kontrollként alkalmazott protein-kináz katalitikus alegységhez hasonlóan képes volt a defoszforilált és parciálisan hidrolizált kazein szubsztrátot a $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ γ -foszfátjával foszforilálni. A protein-kináz katalitikus alegység csak igen kevéssé foszforilálja az exudátum fehérjét. (Hosszabb, 3 napos expozícióval az SDS-PAGE mintázat fősávjaiban, és a felső régió nagyobb fehérjetartalmú sávjaiban jelent meg ^{32}P -jelölés.) Az exudátumhoz $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -t adva, 3 napos expozíciót követően váltak láthatóvá az exudátum jellegzetes sávjai. Valamennyi jelentősebb fehérjetartalmú sáv látható volt az autoradiogrammon. Tehát az exudátum protein-kinázának szubsztrátja lehet az exudátum többi fehérjekomponense. Az exudátumban kimutatott protein-kináz sokféle fehérje-szubsztrátot képes foszforilálni, defoszforilált kazeint, az

exudátum valószínűleg valamennyi fehérje-komponensét. A protein-kináz a szerin-treonin kinázok csoportjába tartozik. Együttes előfordulása a rostacsó exudátumban a calmodulinnal azt jelzi, hogy protein-kináz aktivitása Ca-calmodulin-függő lehet (1, 3, 8).

N-terminális aminosav szekvencia meghatározása: blokkolt N-terminális

A rostacsó exudátum 2D mintázatában a két legnagyobb mennyiségben jelenlevő fehérjekomponenst: a STEP 29 és STEP 40 jelűeket választottuk ki szekvenálásra, és 2D elválasztással állítottunk elő megfelelő mennyiséget (kb. 10 µg).

Az N-terminális aminosav szekvenálás eredménye azt mutatja, hogy a fehérjék nem rendelkeznek szabad amino-terminálissal, ezért az aminosav szekvencia egy részletének felderítéséhez szükséges a molekulák előzetes specifikus hasítása. A blokkolt (többnyire acetilált) N-terminális fiziológiai értelemben is védetté teszi a fehérjéket, meggátolja proteolitikus szignál hozzákapcsolását az amino-terminálishoz (1).



UTÓSZÓ

A phloem rostacső elemei hosszú időn át életben maradnak, akár évekig működőképesek lehetnek. Mivel sejtmagjuk nincs, fehérjeszintetizáló apparátusuk az érés folyamán degradálódik, valószínű, hogy a rostaelemek működésének fenntartásához intercelluláris fehérje transzport szükséges, melyben lényeges szerepet töltenek be a phloem nedv mobilis fehérjei.

A fehérjeszintézis valószínű helye a kísérősejt. Mikroautoradiográfias vizsgálatok bizonyítják, hogy a STEPs szintézise során elsősorban a kísérősejtek fehérjei jelölődnek. A kísérősejtek és rostacső elemek között található speciális plazmodezmák valószínűleg lehetővé teszik, hogy 10kD-nál nagyobb fehérjék is átjussanak rajtuk egyik sejtől a másikba, noha ezek a molekulák meghaladják a plazmodezma SEL értékét. Vírusfehérjék (TMV P30 fehérjéje) növénybeli mozgásával kapcsolatos vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a plazmodezmák szerepet játszanak a fehérjék, ill. mRNsek sejtek közötti forgalmában. A chaperonok ennek a rendszernek a lehetséges elemei. Ez az irány a plazmodezma kutatás felé vezet.

Ez azonban a kimutatott 115 fehérje töredéke, nem tudunk egységes képet alkotni a mobilis fehérjét funkciójáról. Az immunológiai azonosságra építő Western-blot-tal való fehérjeazonosítás a jövőben is tovább folytatódik, azonban a “fegyvertár” génszintű technikával egészül ki. Már elkészült a hypocotylból, szikleveleiből származó cDNS könyvtár. A géneket expresszáltatva a STEPs-antitestekkel kihalászhatók a phloem mobilis fehérjeit kódoló szekvenciák. A thioredoxint és cisztatint már ezzel a módszerrel azonosították.

IRODALOM

1. **Pécsváradi, A.:** Specifikus fehérjék a *Ricinus communis* L. rostacső exudátumában: elválasztás, jellemzés, funkció. Doktori értekezés. 1993.
2. Sakuth, T., Schobert, C., **Pécsváradi, A.**, Eichholz, A., Komor, E., Orlich, G.: Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and in-vivo labelling. PLANTA 191:207-213, 1993.
3. Schobert, C., Szederkényi, J., **Pécsváradi, A.**, Komor, E.: Identification and function of sieve tube proteins. BIOL. PLANTARUM 36:17, 1994.
4. Gottschalk, M., Schobert, C., **Pécsváradi, A.**, Leiker, G., Komor, E.: Localization of sieve tube exudate proteins from *Ricinus communis* L.. BIOL. PLANTARUM 36:8, 1994.
5. **Pécsváradi, A.**, Zsoldos, F.: NR and NiR activities in wheat seedlings exposed to nitrite. BIOL. PLANTARUM 36:201, 1994.
6. Zsoldos, F., Vashegyi, Á., **Pécsváradi, A.:** Effects of nitrite on potassium uptake of rice seedlings at different pH values. BIOL. PLANTARUM 36:212, 1994.
7. Zsoldos, F., Vashegyi, Á. and **Pécsváradi, A.:** Effects of pH and nitrite on potassium uptake and growth of rice seedlings. J. PLANT PHYSIOL., 144:358-361, 1994.
8. Schobert, C., Großmann, P., Zhong, W., Szederkényi, J., **Pécsváradi, A.**, Komor, E.: Identification and function of conserved sieve tube proteins; Botanikertagung '94. Bayreuth, Germany, Sept. 11-19, 1994. Verlag Lorenz Ellwanger ISBN 3-925361-25-1, pp:401, 1994.
9. Gottschalk, M., Komor, E., **Pécsváradi, A.**, Leiker, G., Schobert, C.: Localization of sieve tube exudate proteins from *Ricinus communis* L.; Botanikertagung '94. Bayreuth, Germany, Sept. 11-19, 1994. Verlag Lorenz Ellwanger ISBN 3-925361-25-1, pp:397, 1994.
10. Schobert, C., Großmann, P., Gottschalk, M., Komor, E., **Pécsváradi, A.** and z.Nieden, U.: Sieve tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. PLANTA 196:205-210, 1995.
11. Zsoldos, F., Vashegyi, Á., **Pécsváradi, A.**, Haunold, E. and Herger, P.: Effects of nitrite and nitrate on potassium uptake of rice and wheat seedlings at different pH values. ACTA PHYTOPATHOLOGICA ET ENTOMOLOGICA HUNGARICA. 30:93-97, 1995.

12. **Pécsváradi, A.** and Zsoldos F.: Nitrate reductase and nitrite reductase activity in nitrite- and chlorate-stressed rice seedlings. *PLANT PHYSIOL. BIOCHEM.* 34:659-663, 1996.
13. Zsoldos, F., Vashegyi, Á., **Pécsváradi, A.**, Haunold, E. and Herger, P.: Growth and ion transport of nitrite-stressed wheat and rice seedlings. *PLANT PHYSIOL. BIOCHEM.* Special issue:142-143, 1996.
14. **Pécsváradi, A.** and Zsoldos F.: NR and NiR activity in nitrite- and chlorate-stressed rice seedlings. *PLANT PHYSIOL. BIOCHEM.* Special issue:143, 1996.