

**KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA A NÖVÉNYI JELÁTVITELI
RENDSZER EGY ELEMÉRE, A KALCIUM-FÜGGŐ, KALMODULIN-
FÜGGETLEN PROTEIN KINÁZ MŰKÖDÉSÉRE**

Pestenácz Anikó

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
környezeti biokémia és biotechnológiai doktor (Ph.D.) program



Témavezető:

Dr. Erdei László tanszékvezető egyetemi tanár
Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Növényélettani Tanszék

Szeged

2001

BEVEZETÉS

Minden élőlény a környezetével szoros kölcsönhatásban éli le életét. A növények és az állatok sok tekintetben eltérően válaszolnak az őket ért ingerekre, környezeti hatásokra, mégis számos azonos vagy nagyon hasonló vonás található bennük. Különösen igaz ez akkor, ha a jelátviteli folyamatok biokémiáját tanulmányozzuk.

A legtöbb környezeti hatás megváltoztatja a citoplazma kalcium-szintjét és az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő molekulává teszi ezt a fiziológiailag is fontos kationt a növények számára. A jel továbbításában és felerősítésében kalcium-szabályzott fehérjék, többek között a fehérjék foszforilációját szabályozó kinázok vesznek részt. A növényekben gyakori kalcium-függő, de kalmodulin-független protein kinázok (CDPK) nagyfokú szekvencia homológiája a patkány agyi mikroerek endotél sejtjeiből izolált kalcium/kalmodulin-függő protein kinázokkal (CaMKII). A CDPK a kalcium-függő vagy más néven kalmodulin-szerű fehérjerészt tartalmazó protein kinázok nagycsaládjába tartozik, amelyekre jellemző, hogy aktiválásuk nem minden esetben igényel kalmodulint.

Dolgozatom a kalcium-függő, de kalmodulin-független protein kinázzal (CDPK) foglalkozik, amelyet Harmon és munkatársai írtak le 1987-ben, molekuláris jellemzését pedig Harper és munkatársai adták meg 1991-ben. Különböző stressztoleranciájú gabonanövényből (búza, kukorica, kenyércirok) és egy tengerparti növényből (*Aster tripolium*) izolált CDPK néhány biokémiai jellemzőjével foglalkoztunk. Megfigyeltük a CDPK stressz-indukcióját, annak ozmotikus- és ionos stressz koncentrációtól-, valamint kezelési időtől való függését az aktivitás ill. autofoszforilációs mintázatok nyomonkövetésével.

Különböző környezeti hatások, szárazság- és sóstressz, hormonok és mechanikai ingerek a kalcium-szint változása mellett általában abszcizinsav szint emelkedéssel is járnak (Knight és mtsai, 1992). A CDPK-k és a stressz-abszcizinsav egymással szoros kölcsönhatásban szabályozzák az adaptációs folyamatokat. Az abszcizinsavas előkezelés stressz-indukciót csökkentő hatását már többen vizsgálták. Cirok növényen kapott eredményeink alapján feltételezzük, hogy az előkezelés beindítja a növény védekezési mechanizmusait, felkészíti egy későbbi, erősebb stresszhatás elviselésére.

CÉLKITŰZÉS

A stresszor, mint jel érzékelése és a génexpresszió közötti jelátvitel út nem minden eleme ismeretes. Különösen kevés adat áll rendelkezésre a kalcium-függő protein kináz (CDPK) stressz-indukciójára vonatkozóan.

Dolgozatomban a következő kérdésekre kerestük a választ:

a, Milyen általános biokémiai jellemzőkkel rendelkezik a CDPK ? A kináz kalcium- és kalmodulin-függőségének vizsgálata autofoszforilációs képessége alapján, valamint foszforilálási aktivitásának mérése exogén szubsztrát jelenlétében és annak gátlása másodlagos metabolitokkal.

b, Kimutatható-e a CDPK stressz-indukciója? A stresszhatások kiváltását ozmotikus- (PEG), só- (NaCl) és UV-B kezelésekkel, főként gabonanövényeken folytatjuk.

c, Hogyan jellemezhető az esetleges stressz-indukció? Függ-e a stresszor koncentrációjától és a kezelési idő hosszától a CDPK aktivitás-változása ozmotikus- és sókezelés esetében?

d, Van-e különbség az eltérő stressztoleranciával rendelkező növényfajok, -fajták között a CDPK-indukció mintázatában?

e, Van-e az abszcizinsavas előkezelésnek védő, stressz-csökkentő hatása a CDPK aktivitás-változására?

f, Milyen szerepet tölt be a vizsgált CDPK a jel és a génexpresszió közötti jelátviteli útvonalban?

Anyagok és módszerek

Növénynevelés és kezelések

Az ozmotikus stresszhez kapcsolódó mérésekhez mérsékelten szárazságtűrő kukorica vonalat (*Zea mays* L. cv. Pioneer 3950) és szárazságtűrő kenyércirok vonalat (*Sorghum bicolor* L. Moench cv. ICSV. 112, Hyderabad, India) használtunk (Masojidek és mtsai, 1991). A NaCl-os kezeléseket a szárazságtűrő "Tiszatáj" és szárazságra érzékeny "Kata" búza csíranövényeken (*Triticum aestivum* L. cv. GK-Tiszatáj és GK-Kata, Gabonakutató Intézet, Szeged) végeztük, valamint egy tengerparton élő sókedvelő növényen, az *Aster tripolium* ssp. *tripolium*-on is tanulmányoztuk. Az UV-B kezeléshez csak a "Tiszatáj" vonalat használtuk, a CDPK enzimaktivitás mérésekhez pedig a *Triticum aestivum* L. cv. Mv-8 (Gabonakutató Intézet, Szeged) fajtából vettünk mintát. A csíranövényeket vízkultúrában neveltük módosított Hoagland tápoldatban (Erdei és mtsai, 1984).

A nem-ionos ozmotikus kezelés PEG 6000-rel (M, 6000-7500) történt. Az alkalmazott koncentráció 0, 100 és 200 mOsm (kg H₂O)⁻¹ PEG. A kezelési időtartama 0, 15, 30, 60 és 120 perc, ill. 3 nap volt. Búzánál (Kata és Tiszatáj) az ozmotikus kezelés a kiültetés 12. napján kezdődött és 0, 100, 200 és 300 mOsm koncentrációjú PEG 6000 oldattal 1, 7 és 72 óráig tartott.

A sóstressz létrehozásához NaCl-os kezelést alkalmaztunk 0, 50, 100 és 150 mM koncentrációban búzában 1, 7 és 72 óráig. Az *Aster tripolium*-ot egy hónapig kezeltük 0, 2, 10 és 300 mM NaCl koncentrációjú tápoldatban.

Az UV-B kezelés olyan Philips típusú (TL 100W/01) fénycsővel történt, amelyek jellemzője, hogy a kibocsátott, 2,5 Wm⁻² erősségű sugárzás nagyrésze a 310-315 nm hullámhossz tartományba esik (λ_{\max} =311/312 nm) (Santos és mtsai, 1993). A búza csíranövényeken (Tiszatáj) végzett kezelés a kiültetéstől számított 11 napig tartott. Mintákat a 4., 5., 6., 7., 8. és 11. napon vettünk.

Az abszcizinsav stresszt kivédő hatásának vizsgálatára a 3 napos PEG kezelés előtt 3 napos 0,1 μ M-os ABS előkezelést hajtottunk végre cirok gyökereken.

Aktivitás mérés és foszforilációs reakciók

A citoplazmatikus fehérjék kivonása után az összfehérje meghatározását Lowry és mtsai (1951) módszerével végeztük. A fehérjék radioaktív jelölése Oláh és Kiss (1986) módszerével történt. A jelölt fehérjéket SDS - PAGE -sel, a standard módszer szerint (Laemmli, 1970) választottuk szét, 3 %-os gyűjtőgél és 11 %-os elválasztógél használva. Az autoradiogramokat (ZX Spectrum mikrokomputerrel összekapcsolt) lézerezimométer segítségével értékeltük ki.

A kalcium-függő protein kináz aktivitás méréséhez a CDPK szubsztrátjaként használatos syntide -2 szintetikus oligopeptidet használtuk (Hashimoto és Soderling ,1987). A CDPK foszforilációs aktivitásának gátlására tanninsavat (0,1 , 1, 5 és 10 μM) és ellagsavat (0,1 , 1, 10, 50 és 100 μM) adtunk a reakcióelegybe. A reakció elindítása mintánként 1 μM [γ - ^{32}P] ATP (spec. akt.: 110 PBq mol $^{-1}$, 37 kBq) hozzáadásával történt és 1 percig inkubáltuk + 4 °C-on. A jelölt foszfát syntide-2 szubsztrátba történő beépülését folyadék szcintillációs mérővel követtük nyomon.

Atomabszorpciós mérések

Az előkészített minták K $^{+}$, Na $^{+}$ tartalmának meghatározása Hitachi Z 8200 típusú polarizált Zeeman atomabszorpciós spektrofotométerrel történt.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A dolgozat témája egy növényi kalcium-függő, de kalmodulin független protein kináz ozmotikus indukciójának vizsgálata különböző gabonanövényeken.

Három gabonanövényt, egy mérsékelten szárazságtűrő kukorica fajtát, egy jó szárazságtűrő cirok fajtát és két különböző szárazságtűrésű búza fajtát, valamint egy sőtűrő tengerparton élő növényt, az *Aster tripolium ssp. tripolium*-ot használtunk a stressz-indukciójának bemutatására. Korábbi kísérletek igazolták, hogy só és ozmotikus

stresszhatásra a kukorica és a cirok eltérő fiziológiás válaszokat ad, így jó alapjául szolgálhat a stressztolerancia és a CDPK-indukálhatóságának vizsgálatára. Különböző stresszhatásokra (szárazság-, só- és UV-B-stressz) létrejövő CDPK-indukcióját és annak néhány jellemzőjét vizsgáltuk. Kontroll körülmények között a CDPK néhány jellemzőjét, kalcium-, kalmodulin-függőségét és azok gátlását, exogén szubsztrát foszforilálását írtam le. Szárazság- és sóstressz esetén a CDPK-indukcióját (52-53 kDa) figyeltük meg, az UV-B kezelésnek gyenge induktív hatása volt a megadott molekulásúly tartományban. A CDPK-indukció függött a stresszor koncentrációjától és a kezelési idő hosszától. Eltérést tapasztaltunk a különböző stressztoleranciájú fajok- és fajták között. Ciroknál az abszcizinsavas előkezelés stresszválaszt csökkentő szerepét is vizsgáltuk.

1., A cirok gyökér kivonatból izolált protein kináz jellemzésekor megállapíthattuk, hogy a fehérje egyértelműen kalcium-függőnek bizonyult, a kalcium kelátor EGTA hozzáadásakor nem vagy csak igen gyenge jeleket lehetett kimutatni. A protein kináz kalmodulin-független, ami a növényi CDPK-k sajátosága, bár a kalmodulin antagonistá trifluoperazin (TFP) gátolta a foszforilációs aktivitást. Molekulásúlya 52-53 kDa között figyelhető meg (Pestenác és Erdei, 1996). A protein kinázra jellemző az autofoszforiláció és az exogén szubsztrát (syntide-2) foszforilálása. Két másodlagos metabolit, a tanninsav és az ellagsav enzimaktivitást gátló hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy nagyobb koncentrációban (5-10 μM) a tanninsav gátlószerként működött, míg az ellagsav nagyobb koncentrációban sem gátolt. A gátlás valószínűleg nem specifikus, de néhány protein kinázra jellemző. A fenti tulajdonságok alapján feltételezzük, hogy az általunk kimutatott protein kináz a kalcium-függő, kalmodulin-független protein kinázok (CDPK) családjába tartozik .

2., A CDPK környezeti stressz hatásokra, szárazság-, só- és UV-B-stresszre, különböző mértékű indukciót mutat. A CDPK-indukcióra legkevésbé az UV-B sugárzás hatott. UV-B kezelésre az autofoszforilációban bekövetkező változások jó egyezést mutattak a védelemben szintén szerepet játszó antioxidáns enzimek aktivitás-változásaival (Barabás és mtsai, 1998). A CDPK (52 és 65 kDa) esetében is a kezelést

követő 7. naptól tapasztalható jelentős aktivitás-növekedés. UV-B-indukciót a CDPK a 65 kDa-os jelölt fehérjénél tapasztaltunk. Valószínűleg más jeltovábbító molekulák és folyamatok is szerepet játszhatnak a CDPK-n kívül.

3., A CDPK stressz-indukciójának időfüggését vizsgálva cirokban már 1 óras ozmotikus (PEG) kezelés is elegendőnek bizonyult az autofoszforiláció megjelenéséhez, míg kukorica gyökérnél 2 óras PEG kezelés hozott létre enzim-indukciót. Sóstressz esetén szintén az 1 óras NaCl kezelések jelentették a legerősebb CDPK-indukciót. A 7 óras kezelés már gyengébb, a 72 óras, azaz 3 napos sóstressz pedig a legalacsonyabb induktivitással rendelkezett. Mind az ozmotikus, mind a sóstressznél megfigyelhető, hogy a stresszor koncentrációjával arányosan magasabb a létrehozott autofoszforilációs jel (Pestenácz és Erdei, 1996).

4., A CDPK-indukció jelentős eltérést mutatott az eltérő szárazságtűrűsű növények, a cirok és a kukorica, valamint a két búza fajta a "Kata" és a "Tiszatáj" között. A gyengébb szárazság-toleranciával rendelkező kukorica és "Kata" CDPK relatív aktivitása igen alacsony értéknek bizonyult. A stressztoleránsabb "Tiszatáj", de különösen a cirok esetében jóval magasabb CDPK aktivitásokat mértünk.

5., Az abszcizinsavas előkezelés CDPK-indukciót csökkentő hatását mutattuk ki ozmotikus (PEG) kezelést követően cirok gyökérben. Feltételezéseink szerint, a 3 napos előkezelés (0,1 μ M ABS) beindította a növény védekező reakcióit, bizonyos stressz fehérjék szintézisét. Valószínűleg a későbbi ozmotikus stressz (200 mOsm PEG) már nem váltott ki az előkezelés nélkülihez hasonlóan erőteljes hatást, azaz kisebb aktivitással működő vagy kevesebb CDPK is elegendő volt a jelátviteli mechanizmusok szinten tartásához (Pestenácz és Erdei, 1996).

A természetes körülményeket jobban modellező, az összetett stressz hatások közti kapcsolatokat és összefüggéseket leíró "cross-talk" elmélet nagyon fontosnak tartja az abiotikus stresszek jeltovábbításában szerepet játszó közös elemeket. Ilyenek pl. a

kalmodulin, a CDPK-k és a Ca^{2+} -függő foszfatázok, amelyek fontos kapcsolódási pontokként jönnek szóba a különböző jelátviteli mechanizmusok között. A CDPK része az abszcizinsav jelátviteli folyamatainak is, ezért tulajdonságainak és stressz-indukciójának részletesebb vizsgálata lényeges lépést jelentene a növények stresszválaszainak jobb megértésében és a stressztolerancia esetleges javításában.

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk

1. Erdei, L., Pestenác, A., Barabás, K. and Szegletes, Zs. (1995) Adaptive responses of plants under stress conditions. - *Acta Phytopath. Entomol. Hung.* **30**: 27-37. (imp.f.₁₉₉₉: 0,00)
2. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. and Pestenác, A. (1996) Responses in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiology* **147**: 599-603.(imp.f.₁₉₉₉: 1,195)
3. Pestenác, A. and Erdei, L. (1996) Calcium-dependent protein kinase in maize and sorghum induced by polyethylene-glycol. - *Physiol. Plantarum* **97**: 360-364. (imp.f.₁₉₉₉: 2,46)
4. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K., Pestenác, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B. and Dér, A. (1998) Environmental stress and the biological clock in plants: Changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J.Plant Physiology* **152**: 265-271. (imp.f.₁₉₉₉: 1,195)
5. Barabás, K., Szegletes, Zs., Pestenác, A., Fülöp, K. and Erdei, L. (1998) Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. - *J. Plant Physiology* **153**: 146-153.(imp.f.₁₉₉₉: 1,195)
6. Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenác, A. and Páldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. - *Biol. Plantarum* **43(4)**: 637-640.(imp.f.₁₉₉₉: 0,566)

A dolgozat témájához nem kapcsolódó publikáció

1. Krizbai, I.A., Deli, M.A., Pestenác, A., Siklós, L., Szabó, Cs.A., András, I. and Joó, F. (1998) Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. - *J. Neurosci. Res.* **54**: 814-819.(imp.f.₁₉₉₉: 2,874)

A dolgozat témájához kapcsolódó előadások, poszterek

1. **Pestenácz, A., Szabó Nagy, A. & Erdei, L. (1994)** Ozmotikus stressz és ABA hatása a szolubilis savas foszfatázra és egy Ca^{2+} -függő protein kinázra cirokban. *XXIV. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Hungary.* (poszter)
2. **Pestenácz, A., Szabó-Nagy, A. & Erdei, L. (1994)** The effects of osmotic stress and ABA treatment on the soluble acid phosphatase and a Ca^{2+} -dependent protein kinase in sorghum root. *9th FESSP Congress, Brno, Czech Republic. Biol. Plant., 36: S366.* (poszter)
3. **Pestenácz, A., Szabó-Nagy, A. & Erdei, L. (1994)** Changes in Ca^{2+} -dependent protein kinase and soluble acid phosphatase under salt, osmotic and UV-B stresses in plants. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress, Szeged, Hungary.* (poszter)
4. **Erdei, L., Laszlavik, M., Pestenácz, A., Szabó Nagy, A., Szegletes, Zs., Fodor, E., Barabás, K. (1994)** Stressz és adaptáció növényekben. [Stress and adaptation in plants, language: Hungarian]. *SZBK Napok, Szeged, Hungary.* (előadás)
5. **Pestenácz, A. és Erdei, L. (1995)** Polyethylene glycol-induced Ca^{2+} -dependent but calmodulin-independent protein kinase in maize and sorghum [language: English]. *XXV. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Hungary.* (előadás)
6. **Miklós, E., Pestenácz, A., Fodor, E. and Szabó-Nagy, A. (1995)** Cadmium toxicity in plants [language: Hungarian]. - *Proc. III. Internatl. Environmental Conference, Kecskemét, Hungary.* (előadás)
7. **Pestenácz, A. és Erdei, L. (1995)** Ozmotikum által indukált Ca^{2+} -függő protein kináz a növényekben [Osmotic stress-induced Ca^{2+} -dependent protein kinase, language: Hungarian]. *SZBK Napok, Szeged, Hungary.* (előadás)
8. **Barabás, K., Fülöp, K., Kalmár, L., Órdög, M., Pestenácz, A., Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1996)** Ion accumulation, regulation of stomata movement, Ca^{2+} -dependent protein kinase activity and changes in the antioxidative system as a function of NaCl supply in *Aster tripolium* plants. *XXVI. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, Hungary.* (poszter)
9. **Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, N.K., Pestenácz, A., Kovács, A. and B. Tóth (1996)** Effects of environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach, Florence, Italy. Plant Physiol. Biochem., Special Issue: 267.* (poszter)

10. Szegletes, Zs., Barabás, N.K., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kovács. A., Tóth, B., Kalmár, L. and Erdei, L. (1996) Szárazság-, só- és UV-B stressz oxidatív komponensei növényekben [Oxidative components of drought, salt and UV-B stresses in plants, language: Hungarian] *Straub-napok* (SZBK Napok), Szeged, Hungary. (előadás)
11. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, N.K., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L. Kovács. A. and B. Tóth (1997) Environmental stress and the circadian rhythm in plants [language: Hungarian]. *XXVII. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
12. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, N.K., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L. Kovács. A. and B. Tóth (1997) Environmental stress and the circadian rhythm in plants [language: Hungarian]. "Stress of Life" *Stress and Adaptation from Molecules Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
13. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, N.K., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L. Kovács. A., Tóth, B. and Dér, A. (1997) A környezeti stressz és a cirkadián ritmus lehetséges kapcsolata növényekben. [The effects of the environmental stresses on the circadian rhythm of plants, language: Hungarian]. VI. Magyar Növényélettani Kongresszus, Budapest, Hungary. (előadás)