

Doktori értekezés tézisei

Egy lucerna nemszimbiotikus hemoglobin (Mhb1) izolálása és jellemzése

Készítette: Seregélyes Csaba

Témavezetők:
Prof. Dudits Dénes
Dr. Horváth V. Gábor

**Növénybiológia Intézet
MTA Szegedi Biológiai Központ**

**Szegedi Egyetem
2002**

Bevezetés

A növényi hemoglobinokat tulajdonságaik alapján 3 fő csoportba sorolhatjuk. A legrégebben felfedezett csoportba (1939) a szimbiotikus hemoglobinok tartoznak. Ezek a fehérjék a nitrogénkötő mikroorganizmusokkal szimbiózisban élő növényekben a szimbionta partnert látják el oxigénnel.

A legutóbb (2001-ben) felfedezett növényi hemoglobin-csoportot strukturális sajátosságából adódóan „2-on-2 hemoglobins”-nak nevezték el. A csoport idáig egyetlen tagja (*AHB3*) aminosav homológia alapján a mikroorganizmusok hemoglobinjai csonka változatának tekinthető, és hipoxia hatására leszabályozódik.

A harmadik fő csoportot alkotó nemszimbiotikus hemoglobinokat, más néven phytoglobinokat, is sokkal később (a '80-as években) fedezték fel, mint a szimbiotikusakat. Közös jellemzőjük a szimbiotikus hemoglobinokénál nem ritkán egy nagyságrenddel erősebb O₂-kötő képesség és az, hogy feltehetően minden növényben jelen vannak, nemcsak a szimbiózisban élőkben. Ez utóbbi miatt a nemszimbiotikus hemoglobinokat tekintik ősibbnek és úgy vélik, hogy a szimbiotikus hemoglobinok génduplikáció révén belőlük alakultak ki. Ezt a csoportot két alcsoportra tagolták tovább. Az első alcsoportba a hipoxiára indukálódó gének, a másodikba az előzővel közeli homológiát mutató, de hidegstresszre indukálódó, mostanáig egyetlen ilyen gén tartozik. A közelmúltban publikált adatok alapján a phytoglobinok funkcióját illetően két fő irány határozható meg.

Az egyik szerint a nemszimbiotikus hemoglobin gének akkor indukálódnak, amikor a sejtben az ATP szintje lecsökken. Ennek oka lehet hipoxia, ill. megnövekedett metabolikus aktivitás (pl. sejtosztódás a merisztémában) is. Pl. egy kísérlet szerint részleges hipoxiás (5% O₂) kezelést

követően az árpa phytoglobint túltermelő kukorica sejtszuspenzió ATP szintje a kontrollénál kb. 30%-kal magasabbnak bizonyult.

A másik funkció egyrészt akkor körvonalazódott, amikor tanulmányok jelentek meg a nitrogén-monoxid (NO) különböző szerepeiről a növény életében, különös tekintettel a növényi patogének elleni védekezési reakcióban betöltött funkciójára. Másrészt pedig akkor, amikor világossá vált, hogy az egysejtűektől a magasabbrendű állati szervezetekig mindenütt nagy jelentőséggel bír a növényekben a közelmúltban is csak részben leírt kölcsönhatás az NO és a hemoglobinok között. Az említett reakciót növényekben hipoxiának kitett gyökerekben történő NO-termelődés után figyelték meg először (2002), mivel a nemszimbiotikus hemoglobint túltermelő gyökerekben az NO szintje lecsökkent a kontroll növényekben mért értékekhez képest. Jelen esetben a phytoglobinnak néhány mikroorganizmus hemoglobinjához hasonlós detoxifikáló funkciót tulajdonítottak, mivel feltételezhető volt, hogy az oxihemoglobin az NO-t NO₃⁻-á oxidálta tovább, ami növények esetében kevésbé toxikus és jobban felhasználható vegyület. Emellett a nitrozilhemoglobin (NO kötődése a hemhez) képződése is csökkentheti a sejthalált is előidézni képes NO szintjét.

Mivel a nemszimbiotikus hemoglobinok termelődését a gyökéren kívül más növényi szövetben is megfigyelték (pl. szárban, rozettalevélben), ezért feltételezik, hogy nemcsak a gyökérben és nemcsak hipoxia alatt hathat köcsön az NO a phytoglobinokkal, hanem pl. a patogének elleni válaszreakció során e kölcsönhatás képes befolyásolni az NO-függő jelátviteli mechanizmust is, megváltoztatva a növény védekezőképességét. Ezért helyezett jelen tanulmány is nagy hangsúlyt az NO és a phytoglobinok *in vivo* kölcsönhatásának és az ebből adódó következmények vizsgálatára.

Célkitűzések

Célul tűztük ki az általunk izolált *Mhb1* gén molekuláris és funkcionális jellemzését, mivel a phyto globinok szerepe a növény életében még tisztázásra vár. Ennek érdekében a következő kérdésekre kerestünk választ.

- I. Az *Mhb1* gén és termékének molekuláris jellemzése:
 1. Mely lucerna szövetekben expresszálódik az *Mhb1* gén?
 2. Indukálható-e az *Mhb1* gén transzkripciója a többi nemszimbiotikus hemoglobin esetében korábban már leírt módon (hipoxia, hidegstressz)?
 3. Van-e összefüggés a sejtek metabolikus aktivitásának megváltozása és az *Mhb1* gén indukciója között?
 4. Milyen egyéb olyan tulajdonsággal rendelkezik az *Mhb1* gén ill. fehérje, amely további bizonyítékul szolgál a funkciójára?
- II. *Mhb1* fehérjét túltermelő transzformáns dohánynövények létrehozása és vizsgálata
 1. Van-e különbség a transzformánsok és a kontroll növények fenotípusa között normál körülmények esetén?
 2. Van-e lehetőség egyéb módon különbséget tenni a transzformáns és transzformálatlan növények között az *Mhb1* fehérje működése szempontjából, különös tekintettel annak NO-val való kölcsönhatására?

Alkalmazott módszerek

Munkánk során a cDNS könyvtár készítéshez, a szinkronizáláshoz, a flow cytometriai vizsgálatokhoz, a légzési ráta méréséhez, a stresszkezelésekhez (és az ezeket követő Northern és Western analízishez) és az immunolokalizációhoz lucerna A2-es szuszpenziót (*Medicago sativa* ssp. *varia*) használtunk, lucerna növény (*Medicago sativa*) segítségével történt a kópiaszám- meghatározás, a

térképezés és a szöveti Northern analízis. A plazmid konstrukciókat az általánosan használt rekombináns DNS technikák segítségével készítettük el. Transzgenikus dohánynövényeket *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációval hoztunk létre, majd a transzgén expresszióját immunoblot segítségével ellenőriztük. Az immunoblot és az immunolokalizáció során rekombináns *Mhb1* fehérje ellen előállított poliklonális egér ellenanyagot használtunk. A szalicilsavszint mérése HPLC-vel történt, míg a ROS szintjét az NBT-módszerrel határoztuk meg.

Eredmények és következtetések

Lucerna sejtszuspenzióból készített cDNS könyvtárból izoláltunk egy 483 bp-ból álló, teljes hosszúságú cDNS klónt (*Mhb1*, GenBank azonosító: AF172172), ami egy 160 as. hosszúságú nemszimbiotikus hemoglobint kódol, és tartalmaz minden, a növényi hemoglobinokra jellemző aminosav-motívumot. Kimutattuk, hogy az *Mhb1* gén 1 kópiában van jelen a genomban.

Northern analízissel megállapítottuk, hogy az *Mhb1* mRNS-t felnőtt lucernanövény gyökerében van csak jelen. Kis mennyiségben normál körülmények között tartott lucerna sejtszuspenzióban is kimutattuk a jelenlétét, amely hipoxia hatására jelentősen megemelkedett.

Az *Mhb1* gén indukcióját észleltük közvetlenül a G2/M fázis előtt és részben a G1-ben is, szinkronizált lucerna sejtszuspenzióból izolált mRNS Northern analízise után. Továbbá megállapítottuk, hogy ugyanennek a szinkronizált sejtszuspenzióknak az O₂-fogyasztása G2/M-ben kb. 20, míg G1-ben kb. 50%-kal magasabb egy szinkronizálatlan sejtszuspenzió mért átlagértéknél.

A rekombináns *Mhb1* fehérje ellen létrehozott poliklonális ellenanyag segítségével kimutattuk, hogy hipoxia vagy hidegstressz hatására az *Mhb1* fehérje

szintje lucerna sejtszuszpenzióban nem változott a kezeletlen szuszpenzió Mhb1-szintjéhez képest. Mivel az elleanyag ezt a 18 kDa tömegű fehérjét specifikusan ismerte fel, ezért elektronmikroszkópos immunolokalizációt is végrehajtottunk a szuszpenziósejteken. Ennek eredményeként megtudtuk, hogy az Mhb1 fehérje főként a sejtmagban (de nem a magvacskában), kisebb mértékben pedig a citoplazmában található.

Olyan transzformáns növényeket hoztunk létre, melyek az Mhb1 gént konstitutívan expresszálják a CaMV35S promóter segítségével. A túltermelt Mhb1 fehérje jelenlétét immunoblottal ellenőriztük. A transzformánsok fenotípusa nem tért el a kontroll növényekétől. A kísérletekhez harmadik generációs transzformáns növények magjait használtuk.

Harmadik generációs transzformánsokból és kontroll növényekből származó magokat csíráztattunk és 300 μ M NO-donor vegyülettel (SNP) kezeltük őket. A transzformánsok a kezelés hatására kevésbé maradtak le a növekedésben, bár a vegyületnek jelentős és kb. azonos aspecifikus hatása is volt mind a transzformánsokra, mind a kontrollra nézve.

Kifejlett transzformáns és kontroll növények levelét 5 mM SNP-vel kezelve a transzformáns levelek jelentősen kisebb mértékben nekrotizálódtak, mint a kontroll. A kifejlett növények levelén a csírákhoz képest jelentősen kisebb aspecifikus SNP-hatást láttunk.

Kifejlett transzformáns és kontroll növények levelét baktériummal (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) vagy vírussal (TNV) fertőzve a transzformáns növények levelei kisebb mértékben haltak el, mint a kontrolléi.

Baktériummal (*Pseudomonas syringae*) való fertőzést követően az Mhb1-túltermelő növények levelében mért reaktív oxigén (ROS) és szalicilsav (SA)-szint a kontrollénál nagyobb mértékben emelkedett úgy,

hogy már a fertőzés előtt mért ROS és SA szintek is meghaladták a kontrollban mértékét.

A fenti eredményekből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- Az *Mhb1* gén a kifejlett lucerna növénynek csak a gyökerében expresszálódik, aminek egy lehetséges oka a gyökeret érő relatív hipoxia.
- Az *Mhb1* gén lucerna sejtszuszpenzióban a többi, 1. csoportba tartozó nemszimbiotikus hemoglobinhoz hasonlóan hipoxiára indukálódott, bár az Mhb1 fehérje szintje nem változott meg. Ennek oka lehet az Mhb1 fehérje magasabb turnover, vagy az instabil *Mhb1* mRNS is.
- Az *Mhb1* gén G2/M előtt és G1-ben tapasztalt indukciója jól korrelál ugyanazon szinkronizált sejtszuszpenzió O₂-fogyasztásának változásával. Ez a sejtosztódás szintjén támasztja alá azt a korábbi feltételezést, hogy a nemszimbiotikus hemoglobinok képesek a metabolikusan aktív szövetekben indukálódni. Továbbá a gyökérben tapasztalt *Mhb1* mRNS-szint is magyarázható ezzel a jelenséggel, mert a lucerna növény gyökere viszonylag sok osztódó szövetet (gümők, gyökércsúcsok) tartalmaz.
- Az NO sejtosztódást és fejlődést gátló kisebb hatása a transzformáns csírákra az NO-nak a túltermelt Mhb1 fehérjéhez való kötődésével és így az aktív NO koncentrációjának csökkenésével magyarázható. Ugyanezt a mechanizmust valószínűsíti a kifejlett transzformáns növények már differenciálódott leveleinek SNP-kezelést követő kisebb mértékű nekrozisa a kontrollhoz képest. Ugyanitt

megfigyeltük az elhalás szisztemikus átterjedését a nem kezelt területekre is.

- Szintén az NO-hemoglobin kölcsönhatás mérsékelheti a patogének támadásakor aktiválódó NO-függő jelátviteli mechanizmus hatékonyságát, amely egyébként jelentős alkotóeleme a növényi immunválasznak.
- Ezt támasztja alá a fertőzött transzformáns leveleken mért magasabb ROS és SA-szint is, amely valószínűleg a NO-függő jelátviteli mechanizmus részbeni kiesése miatt van magasabb szinten baktérium-fertőzés előtt és azt követően is. Azonban a sejtek az NO-tól csak részben független védekezési utak megerősítésével vélhetően nem teljesen képesek kompenzálni az NO hiányát.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani **Dr. Dudits Dénes**nek, aki lehetőséget adott e munka elvégzésére és nagymértékben segítette annak létrejöttét.

Köszönettel tartozom **Dr. Horváth Gábornak**, aki közvetlen csoportvezetőmként sokat segített a kísérletek megtervezésében és az eredmények értékelésében.

Ezúton mondok köszönetet **Dr. Barna Baláznak** a kórokozók és a NO hatásának vizsgálatáért, **Dr. Jacek Hennig**nek és **Dr. Dorota Konopkának** a szalicilsavval és a ROS-sal kapcsolatos vizsgálatokért, **Dr. Taras Pasternak**nak a transzformáns növények létrehozásában és vizsgálatában nyújtott segítségével, **Dr. Mustárdy Lászlónak** az elektronmikroszkópos munkáért, **Dr. Lukács Noéminek** az ellenanyagokért, **Sass Lászlónak** az oxigénfogyasztás méréséhez nyújtott segítségével valamint **Dr. Ferhan Ayaydinnak** a szinkronizálással kapcsolatos

teendőkben nyújtott segítségével és a hasznos (nem mindig szakmai) beszélgetésekért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Endre Gabriellának** és **Dr. Kiss György Botondnak** a kópiaszám-meghatározásáért és a térképezésért.

Köszönet illeti **Dr. Robert D. Hillt**, aki mindvégig bátorított és ellenanyag küldésével is segítette a munkámat.

Szeretném még kifejezni hálámat következő munkatársaimnak, akik szintén jelentős segítséget nyújtottak: **Dr. Szekeres Miklós, Dr. Fehér Attilia, Dr. Bakó László, Dr. Mészáros Tamás, Dr. Vass Imre, Dr. Oberschall Attila, Dr. Kovács Izabella, Kovács László, Miskolczi Pál, Cosmin Sicora, Hajós Jánosné, Buczkóné Berecz Erzsébet, Dobrovichné Ágoston Éva, Török Katalin, Pór Gabriella**, valamint a Sejtosztódási és Differenciálódási Csoport minden tagjának.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleim minden szeretetét, segítségét és támogatását.

Publikációk

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 nonsymbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. FEBS Lett. 482, 125-130.

Seregélyes, C., Balázs, B., Hennig, J., Konopka, D., Pasternak, T., Lukács, N., Fehér, A., Horváth, G.V. and Dudits, D. (2002) Phytooglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach (közlésre beküldve)