

Rizs aldo-keto reduktázok szerepe a reaktív karbonilok detoxifikációjában és felhasználásuk stressztűrő genotípusok létrehozására

Ph.D. értekezés tézisei

Turóczy Zoltán

Témavezető: Dr. Horváth V. Gábor
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet
Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK

Szeged

2011

Bevezetés

A környezeti stresszhatások következtében könnyen felborulhat a sejten belüli oxidációs/redukciós folyamatok közti egyensúly, ami reaktív oxigénformák felhalmozódásában és növényeknél a fotoszintézis mértékének csökkenésében nyilvánulhat meg. Előbbieknek a különböző biomolekulákkal történő interakciója (lipidperoxidáció, fehérjék, DNS károsítása) citotoxikus anyagok akkumulációjához vezet.

Az aldo-keto reduktáz (AKR) enzimcsalád egyik klasszikus tagját, az aldóz reduktázt, a poliol anyagcsere út első enzimeként azonosították, amely a glükóz-szorbitol átalakulást katalizálja. Ozmolitok képzésével számos AKR szerepet játszik az ozmoregulációban, ami növényeknél fontos eleme a szárazságtűrésnek. A cukroknak cukor-alkoholokká történő redukálásán kívül egyes AKR-ek hatékonyan redukálnak számos toxikus, lipidperoxidációból és glikolízisből származó reaktív karbonilokat (pld. malondialdehid (MDA), 4-hidroxinon-enál, metilglioxál (MG)). Ezáltal védik a sejteket, segítenek a reaktív karbonilok által okozott fehérjemódosítások megelőzésében. Nemrég, egy *AKR4C9* (*At2g37770*) névvel illetett AKR-t azonosítottak az *Arabidopsis thaliana*-ból és kimutatták, hogy a rekombináns fehérje szubsztátjai között szerepel az egyik fő lipid-peroxidációs termék, az MDA is. Az oxidatív károsodás hatásának a csökkentésére jó példa a lucerna (*Medicago sativa*) AKR-t túltermelő dohánynövények, ahol magasabb fokú rezisztenciát tapasztaltak a metilviologén (MV), nehézfémek, UV-B sugárzás által indukált oxidatív károsodással szemben, mint a vad típusú növényeknél.

Célkitűzések

Munkánk átfogó célja egy olyan transzgénikus stratégia alkalmazása és tesztelése modellnövényen (dohány), amely a reaktív karbonilok méregtelenítésében résztvevő enzimek túltermeltetésén alapszik és e technológia átvitele, felhasználása a haszonnövényeinken (búza, árpa, rizs) gazdasági jelentőséggel bírhat. Részletezve a következő célokat tűztük ki e munka során:

- Stresszindukálható rizs AKR-ek azonosítása különböző bioinformatikai módszerek segítségével (homológia keresések, promóteranalízis stb.), génkifejeződésük vizsgálata különböző stresszkezelések hatására rizs sejtszuspenziókban

- Ugyancsak rizs sejtszuspenziókban az AKR fehérjeindukció nyomkövetése különböző stresszkezeléseket (hőstressz, benzil-alkohol, H₂O₂, abszcizinsav (ABA)) követően

- A leginkább stresszindukált *OsAKR1* gén által kódolt fehérje jellemzése, szubsztrátspecifitásának megállapítása, a reaktív karbonilok méregtelenítésében betöltött szerepének *in vitro* és *in vivo* igazolása

- Rekombináns fehérje rendszerben (a Calvin-Benson ciklus egyik kulcsenzimén, a foszforibulokinázon (PRK)) annak bemutatása, hogy milyen toxikus fehérjemódosító hatásai vannak néhány gyakran keletkező reaktív karbonilnak

- Az *OsAKR1*-nek transzgénikus dohányokban történő túltermeltetése és a túltermelő vonalak stressztűrésének a vizsgálata.

- Jövőbeli célként olyan cisz- illetve transzgénikus próbálkozások, amelyekben egy rizsből származó reaktív karbonil detoxifikáló enzimnek (pld. *OsAKR1*) a túltermeltetésével jobb stressztűrést biztosítanánk gazdaságilag fontos haszonnövényeinknek (pld. rizs és búza).

Módszerek

- 1) Számítógépes programok alkalmazása (génszelekció, promóteranalízis, homológiák alapján történő rizs AKR törzsfá létrehozása, genomikai és proteomikai adatbázisok vizsgálata)
- 2) Molekuláris biológiai módszerek
 - génexpresszió vizsgálat valós idejű kvantitatív PCR segítségével
 - génklónozás
 - *Escherichia coli* és dohány genetikai transzformáció
 - Western hibridizáció
 - rekombináns fehérje termeltetése bakteriális rendszerben
 - enzimikus paraméterek meghatározása
 - *in vitro* fehérjemódosítási kísérletek reaktív karbonilokkal
- 3) Élettani mérések
 - MG szint spektrofotometriás mérése
 - MDA szint meghatározása
 - fotoszintetikus kvantumhatásfok meghatározása
 - AKR enzimaktivitás mérése növényi kivonatokban
 - PRK aktivitás meghatározása
- 4) Stresszkezelések
 - oxidatív stressz- MV kezelés
 - hőstressz
 - stresszkezelések rizs sejtszuszpenziókon (ABA, mannitol, H₂O₂, benzil-alkohol, NaCl)

Eredmények

1) Stresszindukálódó rizs *AKR* gének azonosítása és kiválasztása

Promóteranalízis, homológia keresések (a stresszindukálódó lucerna *MsALR*-el és az *Arabidopsis At2g37770*-vel), kromoszómális lokalizáció, illetve szárazságtűréshez kapcsolt QTL-ek kromoszómális térképezése alapján kiválasztottunk 3 rizs *AKR* gént (*OsAKR1*, *OsAKR2* és *OsAKR3*). Génexpressziós vizsgálat alapján kiderült, hogy ABA hatására több mint 10-szeres transzkriptum növekedést lehetett tapasztalni a kontrollhoz képest az *OsAKR1*-nél, de ez a gén az ozmotikus illetve sóstresszre is magas szinten indukálódott. Az indukciós profil a gén promóterében található elemekkel lehet összhangban. A PlantCARE adatbázis (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) segítségével elemezve a promóter régiókban található transzkripciós faktor kötőhelyeket azt találtuk, hogy az *OsAKR1* promótere tartalmazta a legtöbb ABRE és TGACG központi motívumot tartalmazó promóterelemet, Ezek lehetnek felelősek az ABA és az oxidatív stresszválaszok kialakításáért. Ezen kívül egy új enumerációs algoritmus segítségével is analizáltuk a promótereket. Ez a módszer is megerősítette azt, hogy az előbb említett három gén közül az *OsAKR1* tartalmazza a legtöbb, stresszindukcióban részt vevő transzkripciós faktor kötőhelyet. Ezek alapján választottuk ki az *OsAKR1* gént illetve az általa kódolt fehérjét a további jellemzés szempontjából.

2) A GST-*OsAKR1* fehérje enzimkinetikai jellemzése

Az *Escherichia coli*-ből tisztított rekombináns GST-*OsAKR1* fehérjének megmértük az enzimaktivitását számos aldehid és cukor szubsztráton. Kiderült, hogy az enzim nagy hatásfokkal redukál olyan toxikus és normális élettani körülmények között is nagy mennyiségben keletkező karbonilokat, mint az MG és MDA, valamint néhány cukor szubsztrátot is. Érdemes megemlíteni, hogy az *OsAKR1*-nek mind az MG-re mind pedig az MDA-ra kapott K_m értéke a szakirodalomban leírt élettani koncentrációtartományban van, ami növeli annak a valószínűségét, hogy *in vivo* is fontos szerepe van az említett reaktív karbonilok detoxifikációjában. A másik két rizs *AKR* gén (*OsAKR2*, *OsAKR3*) által kódolt fehérjék esetében nem sikerült aktivitást kimutatni.

Ennek oka lehet a fehérjék másodlagos szerkezetében észlelt különbség, de a szűk szubsztrát specificitásnak nem megfelelő aldehideken végzett mérések is magyarázhatják az aktivitás hiányát.

3) Reaktív karbonilok toxicitása és fehérjemódosító hatásai

Az enzimkinetikai vizsgálatok során kiderült, hogy az GST-OsAKR1 fehérje nagy hatékonysággal képes redukálni reaktív karbonilokat. Az MG egy reaktív oxo-aldehid, ami a glikolízis melléktermékeként nagy mennyiségben képződik. Az MDA egy lipid-peroxidációs termék és főleg linolénsavból keletkezik. Mindkét aldehid toxikus és jól ismert karbonilációs képességéről, amely módosítás általában a fehérjék funkciójának az elvesztését is jelenti. Kísérletileg igazoltuk, hogy az 5 mM MG és 1 mM MDA képes majdnem teljes mértékben inaktiválni olyan fehérjéket mint például a PRK, mely a Calvin-Benson ciklus egyik kulcsenzime. Immunokémiai módszerekkel is sikerült kimutatni a PRK szerkezetében a protein karboniláció által okozott változásokat, ami összhangban volt az aktivitásvesztéssel. Említésre méltó, hogy mindkét fent említett reaktív karbonil szubsztrátja az OsAKR1-nek, ezért egy ilyen méregtelenítő fehérjének a túltermeltetése megoldás lehet e toxikus aldehidek által okozott fehérjemódosítások megelőzésében.

4) Az OsAKR1 fehérje *in vivo* méregtelenítő hatékonyságának igazolása bakteriális és növényi rendszerekben

Munkánk során sikerült kimutatni, hogy az GST-OsAKR1 jó hatékonysággal képes redukálni olyan karbonilokat mint az MG, vagy MDA. Célunk volt igazolni, hogy az OsAKR1 enzim képes ezt a feladatot *in vivo* is ellátni. Sikerült kimutatni az OsAKR1 védőhatását bakteriális rendszerben illetve OsAKR1-et túltermelő dohánynövényekben is. Azok a baktériumsejtek, amelyek termelték a rekombináns AKR fehérjét jobban tolerálták a magas MG koncentrációt, mint a kontroll sejtek. Ez az eredmény rámutat az AKR enzimek konzervált jellegére; azaz egy rizsből származó enzim túltermeltetése képes megnövelni a baktériumsejtek toleranciáját egy toxikus ágenssel szemben, jól kiegészítve a baktérium saját detoxifikációs útvonalait.

A teljes körű jellemzés elengedhetetlen feltétele volt, hogy megvizsgáljuk a gén és a fehérje viselkedését transzgénikus növényekben is. Eredményeink azt mutatják, hogy az OsAKR1-et túltermelő dohányvonalak jobb fotoszintetikus paraméterekkel rendelkeztek a 10 mM MG kezelést követően, mint a vad típusú növények, emellett alacsonyabb MDA koncentrációkat lehetett bennük kimutatni a 100 μ M MV által indukált erős oxidatív stressz hatás után is (főleg a magasan expresszáló B1/1-es vonalban), ami hatékonyabb detoxifikációra mutat. Hőstressz alkalmazása után a transzgénikus levélkorongok fotoszintetikus hozama jóval meghaladta a vad típusúakét. Pozitív korrelációt találtunk a transzgénikus vonalakban megtermelt OsAKR1 fehérje mennyisége és a stressztűrés mértéke között. A túltermelő dohányvonalakban az AKR aktivitás magasabb volt, mint a vad típusban, illetve a hőstresszt követően kevesebb lipid peroxidációs terméket (MDA) sikerült bennük kimutatni. Meglepő módon az endogén MG szint is kisebb volt a transzgénikus dohányokban mind kontroll állapotban, mind pedig hőstresszt követően, ami arra utal, hogy e detoxifikáló enzimnek a túltermeltetése jól kiegészíti a fő MG semlegesítő útvonalat, a glioxaláz rendszert.

E munka eredményei alapján felállított lehetséges kapcsolat az AKR enzimek detoxifikációs hatása és a hőstressztűrés mértéke között újdonságnak számít növényekben. Az OsAKR1 enzim felhasználása transzgénikus megközelítésekben az enzim reaktív karbonil-detoxifikáló tulajdonságán alapszik. A stressztűrésben szerepet játszó gének feltérképezése a hagyományos nemesítési eljárásokkal karöltve rezisztensebb gazdasági haszonnövény genotípusok létrehozására törekszik, és ezek a kutatások jó kiindulási alapot szolgáltatnak a kitűzött cél eléréséhez.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Turóczy Z. Kis P, Török K, Cserhádi M, Lendvai Á, Dudits D, Horváth VG (2011): Overproduction of a rice aldo-keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification, *Plant Molecular Biology* doi 10.1007/s11103-011-9735-7

IF₂₀₀₉ : 3.978

Cserhádi M, **Turóczy Z.** Zombori Z, Cserző M, Dudits D, Pongor S, Györgyey J (2011): Prediction of new abiotic stress genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* according to enumeration-based statistical analysis. *Molecular Genetics and Genomics* (accepted for publication)

IF₂₀₀₉ : 2.838

Egyéb közlemények

László Fodorpatáki, Csaba Bartha, Szabolcs J. Demeter, **Zoltán Turóczy** (2004): Interactive effects of hypoxia, low light stress, and different carbon sources on photosynthetic parameters of the green alga *Scenedesmus intermedius* chod.: *Contrib. Bot.* XXXVIII: 105-111, Univ. Press., Cluj-Napoca, Romania

Turóczy Zoltán, Bartha Csaba, Demeter J. Szabolcs (2004): A sejtsztódás és a sejtszerkezet vizsgálata a vízminőség módosítása során zöldalga tenyészetekben, EME, Múzeumi Füzetek (13)

Zoltán Turóczy (2004): The effect of arsenate and cadmium on the growth and bioproductivity of the cucumber (*Cucumis sativus*) and their uptake regulation by exogenous proline and glycine-betaine supply, *Collegium Biologicum* (5), EME press, Cluj-Napoca

Gábor V. Horváth, **Zoltán Turóczy,** Mátyás Cserhádi, Petra Kis, Katalin Török, László Sass, Dénes Dudits (2006): Engineering of reactive species detoxification pathways for increasing stress tolerance in plants, *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and*

Beyond, Proc. of the 11th IAPT&B Congress, August 13-18, 2006, Beijing, China

Zoltán Turóczy (2008): Engineering plant abiotic stress tolerance by the overexpression of aldo/keto reductases, *Acta Biologica Szegediensis*, 52 (2): 353

Cserháti M, **Turóczy Z**, Dudits D, Györgyey J (2011): The rice word landscape—a detailed catalogue of the rice „motifome” in the non-coding regions. *Genome* (resubmitted after minor revision)

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket PhD fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogom használni. Elismerem, hogy Turóczy Zoltánnak az alábbi közlemények eredményeinek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemények anyagát Ph.D értekezésében felhasználhatja.

Turóczy Zoltán PhD munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a tézise az általa végzett munka eredményeit tükrözi és PhD értekezéséhez felhasznált közlemények létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult:

Turóczy Z, Kis P, Török K, Cserhádi M, Lendvai Á, Dudits D, Horváth VG (2011): Overproduction of a rice aldo-keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification, *Plant Molecular Biology* DOI 10.1007/s11103-011-9735-7

Cserhádi M, **Turóczy Z**, Zombori Z, Cserző M, Dudits D, Pongor S, Györgyey J (2011): Prediction of new abiotic stress genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* according to enumeration-based statistical analysis. *Molecular Genetics and Genomics* (accepted for publication)

.....

Dr. Horváth V. Gábor-témavezető