

Ph.D. értekezés tézisei

A búza (*Triticum aestivum* L.) kloroplasztisz lokalizált  
glutamin-szintetáz enzim allosztérikus szabályozása,  
a szubsztrátumszintű működés tanulmányozása

Németh Edit



Témavezető: Dr. Pécsváradi Attila  
egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék

**Szeged, 2018**

## Bevezetés

A kenyérbúza élelmezési szempontból az egyik legjelentősebb gabonanövényünk. A búza terméshozama jól növelhető optimális nitrogénellátáson keresztül, vagy hatékonyabb nitrogénanyagcserével rendelkező növények előállításával. Utóbbihoz elengedhetetlen az anyagcsere utak és szabályozó faktoraik mély ismerete.

A glutamin-szintetáz (GS, EC 6.3.1.4)  $Mg^{2+}$  kofaktort használó multimer enzim, amely nélkülözhetetlen a búza növekedése és fejlődése során, és szerepe meghatározó a szemfeltöltődés folyamatában, közvetlenül befolyásolva a terméshozamot és a termésminőséget. Ráadásul a GS a nitrogén asszimiláció folyamatában részt vállaló enzimek láncolatának az első olyan tagja, amely ATP hasítása mellett a szervetlen nitrogénformát, az ammóniumot képes szénvázhoz, glutaminsavhoz kötni, melynek eredményeként glutamin jön létre. A GS ezáltal a szén és nitrogén anyagcsere útjait kapcsolja össze.

A búza levelében két GS izoenzimet különböztetünk meg, a citoplazmatikus GS1-et és a kloroplasztisban lokalizált GS2-t. A levél össz GS aktivitásának jelentős része, 80%-a ered a GS2-től, amely a fotorespiráció során képződő ammónia hatékony reasszimilációjához elengedhetetlen izoforma.

A GS2 kiemelt biokémiai jelentősége és lokalizációja alapján feltételeztük, hogy a GS2 működését allosztérikus negatív kooperativitás jellemzi. Az ilyen allosztérikus viselkedés önmagában egy lassabb telítődést és kevésbé váltakozó ütemű termékképződést biztosít egy széles szubsztrátumkoncentráció tartományban. A GS esetében ez hozzájárulhat a biokémiai egyensúly fenntartására a szén és nitrogén anyagcsere között szubsztrátumszinten.

Kísérleteinkben vizsgáltuk a GS alegység összetételét elektroforetikus és protein blot módszerekkel, valamint az allosztérikus szabályozás,

allosztérikus kooperativitás meglétére utaló bizonyítékokat kerestünk és azonosítani kívántuk a bioszintetikus reakció regulátor szubsztrátumát.

A GS-ok két eltérő  $Mg^{2+}$  affinitású kötőhellyel rendelkeznek. A prokarióta GS-ok allosztérikusan szabályozottak, mely szabályozás részben azon keresztül valósul meg, hogy a kisebb affinitású  $n_2$  kötőhelyre  $Mn^{2+}$  vagy  $Mg^{2+}$  köt be. Búzában az  $Al^{3+}$  kötődése a GS-hoz már ismert. Megvizsgáltuk, egyes fémionok, az alumínium ( $Al^{3+}$ ) és a mangán ( $Mn^{2+}$ ) enzimműködésre kifejtett hatását, a mangán kötődését.

Legfontosabb kérdéseink tehát a következők voltak:

- 1) Hogyan jellemezhető a natív konformációjú GS izoenzimek alegységösszetétele? Vannak-e kapcsolódott kölcsönható partnerek?
- 2) Rendelkezik-e a GS2 enzim valamilyen allosztérikus szabályozással? Van-e a GS2-nek allosztérikus regulátor szubsztrátuma? A mérések során jelen van-e olyan effektor, amely befolyásolhatja kinetikai mérések eredményeit?
- 3) Milyen egyszerűsített modellel illetve matematikai formulával karakterizálható a GS2 működése?
- 4) Milyen hatással van egyes fémionok jelenléte a GS2 által katalizált reakcióra? Befolyásolja-e az  $Al^{3+}$  és a  $Mn^{2+}$  a glutaminsav-felhasználás dinamikáját?

## Anyagok és módszerek

A kísérleteinkhez *Triticum aestivum* L *Jubilejnaja* 50 búzafajtát használtunk. A növényeket 3 napos korukig 0,5 mM CaSO<sub>4</sub> oldaton, majd módosított Hoagland tápoldatban (Zsoldos et al., 1986). Az egy hetes növények kiterült második leveleinek középlemezét használtuk fel. A növényi anyagot 200 mM tris, 1 mM redukált glutation, 10 % glicerol, 0,1 % proteáz gátló (Cat.No.: P9599, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) pufferben (pH 7.5) homogenizáltuk, további vizsgálatokhoz a kivonatot frissen használtuk. A fehérjetartalom meghatározása Bradford módszere alapján történt (Bradford, 1976).

A GS aktivitását a módosított szintetáz reakció alapján határoztuk meg. (Pécsváradai et al., 2009; Rhodes et al., 1975)

A fehérjéket natív poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk, 6,5 %-os gélen (Pécsváradai et al., 2009). A GS2-t gél a fizikai roncsolásával nyertük vissza, a fenti kivonó pufferben. A kivonatok frissen használtuk fel a kinetikai mérésekhez. A GS izoenzimek lokalizációját a natív gélben aktivitásuk alapján határoztuk meg (Pécsváradai et al., 2009).

Az izoenzimek homogeneitását két dimenziós gél elektroforetikus elválasztással kombinált western blotlalt határoztuk meg. Az első dimenzióban a fenti natív elválasztást alkalmaztuk, a gél egy szeletét denaturáló 10%-os SDS géltre vittük. A fehérjéket PVDF membránra futtattuk (Nagy et al., 2013). A GS izoenzimeket poliklonális GS antitesttel és alkalikus-foszfátáz konjugált protein A-val tettük láthatóvá a membránon.

A kinetikai mérések kiértékeléséhez a SigmaPlot® (Systat Software, San Jose, California) programot használtuk.

## Eredmények

Elsősorban a Búza GS izoenzimek homogenitását vizsgáltuk. A búza GS1 és GS2 izoenzimeit natív gélen jól elkülöníthetők. Számos ismételt elválasztás során mindig két jól elkülöníthető, fókuszálódott sávot kaptunk, összhangban a korábbi eredményeinkkel (Nagy et al., 2013). A GS-ok alegység összetételét részletesebben kétdimenziós elválasztással (natív + SDS Page) egybekötött western blottal vizsgáltuk. Mind a levélből származó GS1, mind a GS2 különálló jelet adott többszöri ismételt vizsgálatok esetén is (Németh et al., 2018b). Az izoenzimek tehát homogén alegység szerkezettel rendelkeznek, és a GS1 és GS2 egyedi alegységekből épül fel. Ez megegyezik az irodalomban eddig közölt eredményekkel.

Megvizsgáltuk a végtermékek és szubsztrátumok hatását az össz GS aktivitásra nyers kivonatokban. Vizsgálatainkból kiderül, hogy sem a mesterséges, sem a természetes termék alkalmazása nem gátolja az enzimaktivitást. Tehát ezek az anyagok nem zavarják a termékképződést, így a végtermék gátlás sem merült fel szabályozási lehetőségként (Németh et al., 2018b).

Az enzim nyers kivonatban a hidroxilaminra, ebből következőleg az ammóniumionra nézve rendelkezik a legnagyobb affinitással. A hirtelen hiperbolikus szaturáció alapján viszont egyben kizárható annak lehetősége, hogy az ammóniumionnak szabályozó hatása lenne. Az ATP szaturációs görbe telítődése Michaelis-Menten kinetikával jól jellemezhető, ami a kooperativitás hiányát jelzi, ennek ellenére viszont a telődés utáni magas ATP koncentrációnál az aktivitás kis mértékű csökkenését tapasztaltuk. Nyers kivonatban a glutaminsav esetén a magas glutaminsav koncentrációnál telítődő szaturációs görbén 3 nem túl kifejezett inflexiós pontot figyeltünk meg. A görbe a Hill egyenlettel jól jellemezhető, 1-nél kisebb Hill koefficienssel, amely a töréspontok

jelenlétével együtt arra utalhat, hogy az enzim működését allosztérikus negatív kooperativitás szabályozza (Németh et al., 2018b).

A nyers kivonatban kapott ATP és glutaminsav szubsztrátum ellátottsággal kapcsolatos megfigyeléseink a GS2-t tartalmazó tisztított kivonatokban még inkább kifejezettebbek lettek. Az ATP gátló hatása egyértelművé vált. Ennek hátterében egy, a reakció sztöchiometriájához nem szükséges ATP kötőhely állhat. Ez a kísérletes eredmény alátámasztja, egy eddigiekben nem bizonyított kötőhely létezését. Kísérleti eredményeink, és a szakirodalmi adatok összességéből arra következtetünk, hogy az oligomert felépítő monomerek számának a felével egyenlő az aktív helyek száma (Németh et al., 2018b).

A glutaminsav szaturáció esetében tapasztalt inflexiós pontokat a korábban észlelt glutaminsav koncentrációknál kaptuk vissza, melyek a fiziológiához közeli glutaminsav tartományra esnek. A töréspontok a görbét 4 részre osztják, mely arra utalhat, hogy 4 katalitikus hely működését írják le. A Hill egyenlet egyértelmű illeszkedése és a szakaszos telítődés pedig arra utal, hogy az enzim működését allosztérikus negatív kooperativitás jellemzi. Feltételezzük, hogy a GS oktamer szerkezetű, mint, ahogyan az eddig leírt nem rekombináns növényi GS-ok, és az enzimnek a glutaminsav allosztérikus regulátor szubsztrátuma (Németh et al., 2018b).

A fenti eredmények alapján a GS2 működése tehát leírható egy olyan függvénnyel, amely 4 olyan függvény összege, melynek mindegyikét egy 1-nél alacsonyabb koefficiens jellemzi, és az alegységek növekvő  $K_s$  értékkel rendelkeznek (Németh et al., 2018b).

A fémionok hatását elemző vizsgálataink nem adtak olyan eredményt, amely arra utalt volna, hogy a GS2 szubsztrátum függő telítési dinamikája megváltozna  $Mn^{2+}$ , vagy  $Al^{3+}$  hatására. A  $Mg^{2+}$  kötődése viszont esszenciális az enzim aktivitása szempontjából. Emellett bár, az  $Mn^{2+}$  kötődését nem tudtuk közvetlenül kimutatni, de az egyértelmű,

hogy a  $Mg^{2+}$  ionok leszorításáért a  $Mn^{2+}$  tehető felelőssé, ezzel csökkentve a GS aktivitást (Németh et al., 2018a).

A kloroplasztiszban lokalizált GS2 működését tehát a glutaminsav allosztérikusan szabályozza. A glutaminsav, mint regulátor szubsztrátum felhasználását az enzim alegységei között fellépő allosztérikus negatív kooperativitás vezérli. Ezáltal a GS lehetővé teszi a glutaminsav, mint fontos metabolikus intermedier és jelmolekula, fokozatos felhasználását egy széles, fiziológias koncentrációtartományon. A negatív kooperativitásnak köszönhetően a GS2 nemcsak a nitrogén asszimilációjában, de egyúttal a szén-nitrogén egyensúly fenntartásában is fontos szerepet tölt be, amelyet GS2 túltermelő genotípusok létrehozása esetén számításba kell vennünk.

A dolgozatban bemutatott legfontosabb új tudományos eredmények tehát a következők:

- 1) A búzanövény levelének kloroplasztiszban lokalizált GS2 izoenzime allosztérikusan szabályozott.
- 2) A felfedezett allosztérikus szabályozás háttere az allosztérikus negatív kooperativitás, melynek regulátor szubsztrátuma a glutaminsav.
- 3) A szabályozás leírására egy új, saját, közelítő matematikai modellt hoztunk létre.
- 4) A matematikai modellt egy új GS2 működési modellel társítottuk.
- 5) Az ATP supraoptimális koncentrációban gátolja a kloroplasztiszban GS2 aktivitását *in vitro*.
- 6) Búzában a  $Mn^{2+}$  a GS2  $Mg^{2+}$ -kötőhelyeinek feléről, feltehetőleg a kis  $Mg^{2+}$ -affinitású n2 fémionkötőhelyekről leszorítja a  $Mg^{2+}$ -ot.

## Irodalomjegyzék

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.  
doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Nagy, Z., Németh, E., Guóth, A., Bona, L., Wodala, B., and Pécsváradi, A. (2013). Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 48–54. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.001.
- Németh, E., Bónus, L., and Pécsváradi, A. (2018a). Binding of manganese to chloroplast glutamine synthetase and its effect on enzyme activity in wheat. in *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*, eds. L. Tamás and H. Zelenyánszki (JATE Press), 42. Available at: [http://fibok2018.elte.hu/images/FIBOK\\_2018\\_konyvjelzos.pdf](http://fibok2018.elte.hu/images/FIBOK_2018_konyvjelzos.pdf).
- Németh, E., Nagy, Z., and Pécsváradi, A. (2018b). Chloroplast glutamine synthetase , the key regulator of nitrogen metabolism in wheat , performs its role by fine regulation of enzyme activity via negative cooperativity of its subunits. *Front. Plant Sci.* 9, 191. doi:10.3389/fpls.2018.00191.
- Pécsváradi, A., Nagy, Z., Varga, A., Vashegyi, Á., Labdi, I., Galbács, G., et al. (2009). Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. *Physiol. Plant.* 135, 43–50.  
doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01167.x.
- Rhodes, D., Rendon, G. A., and Stewart, G. R. (1975). The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* 125, 201–211.  
doi:10.1007/BF00385596.
- Zsoldos, F., Haunold, E., and Vashegyi, A. (1986). The effects of phosphate supply on uptake of potassium ions, 2,4-D and atrazine by wheat and maize. *Physiol. Plant.* 68, 154–158.  
doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb06611.x.



Referált folyóiratban megjelent közlemények:

*A doktori eljárás alapját képező közlemények:*

(A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó közlemények \*-gal vannak jelölve.)

\***Németh, E.**, Nagy Z., Pécsváradi, A.: Chloroplast glutamine synthetase, the key regulator of nitrogen metabolism in wheat, performs its role by fine regulation of enzyme activity via negative cooperativity of its subunits. *Frontiers in Plant Science* (9):191 (2018) DOI: 10.3389/fpls.2018.00191

**IF: 4,298**

Nagy, Z., **Németh, E.**, Guóth, A., Bona, L., Wodala, B., Pécsváradi, A.,: Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 67:48-54 (2013) DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.03.001

**IF: 2,724**

*Egyéb közlemények*

Pál, M., Majláth, I., **Németh, E.**, Hamow, K., Á., Szalai, G., Rudnóy, Sz., Balassa, Gy., Janda, T.: The effects of putrescine are partly overlapping with osmotic stress processes in wheat. *Plant Science* 268: pp. 67-76. (2018) DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.12.011

**IF: 3,437**

Horvath, B.,M., Kourova, H., Nagy, S., **Németh, E.**, Magyar, Z., Papdi, C., Ahmad, Z., Sanchez-Perez, G.,F., Perilli, S., Blilou, I., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Meszaros, T., Binarova, P., Bogre, L., Scheres, B.: Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO Journal* 36:(9) 1261-1278. (2017) DOI: 10.15252/embj.201694561

**IF: 9,792**

Pál, M., Csávás, G., Szalai, G., Oláh T., Khalilc, R., Yordanovad, R., Gell, G., Birinyi, Z., **Németh, E.**, Janda, T.: Polyamines may influence phytochelatin synthesis during Cd stress in rice. Journal of Hazardous Materials 340: 272-280 (2017) DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.07.016

**IF: 6,065**

Benyó, D., Horváth, E., **Németh, E.**, Leviczky, T., Takács, K., Lehotai, N., Feigl, G., Kolbert, Zs., Ördög A., Gallé, R., Csiszár, J., Szabados, L., Erdei, L., Gallé, Á.: Physiological and molecular responses to heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of *Populus deltoides* and *P. x canadensis*. Journal of Plant Physiology 201: 62-70. (2016) DOI: 10.1016/j.jplph.2016.05.025

**IF: 3,121**

Összesített impakt faktor: **29,437**

## **Előadások és más közlemények:**

*Konferencián tartott magyar nyelvű előadás (előadó):*

**Németh, E.**, Bónus, L., Pécsváradi, A.: Binding of manganese to chloroplast glutamine synthetase and its effect on enzyme activity in wheat. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK), Budapest, március 28-29., **2018**

**\*Németh, E.**, Molnár, R., Nagy, Z., Pécsváradi, A.: Az alumínium aktiválja a plasztidikus glutamin-szintetázt. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, március 21-23., **2014**

*Konferencián tartott angol nyelvű előadás (előadó):*

**Németh, E.**, Nagy, Z., Benyó, D., Pécsváradi, A.: Comparison of copper treated poplar (*Populus* sp.) clones. HUSRB/1002/214/036 Oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, IPA OXIT Conference, Novi Sad, Serbia, november 14-15, **2013**

Nagy, Z., **Németh, E.**, Pécsváradi, A.: Separation of protein content of stressed poplar leaves by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. HUSRB/1002/214/036 „OXIT” Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, Interim Conference, Szeged, Hungary November 20, **2012**

**Németh, E.**, Pécsváradi, A.: Nitrogen assimilation in plants: glutamine synthetase isoforms with special roles. HUSRB/1203/221/173 „PLANTTRAIN” Seminar and Workshops in Szeged Of the Hungary-Serbia IPA Cross-border Cooperation Programme, Szeged, Hungary August 31-september 4, **2015**

*Konferencia előadás (társszerző):*

Pécsváradi, A., Nagy, Z., **Németh, E.**: Changes in glutamine synthetase activity and in protein pattern of wheat leaves after Fusarium infection (lecture). Third Progress Meeting Szeged–Timisoara axis for the safe food and feed SZETISA1 Hungary-Romania Cross-Border Cooperation Programme 2007-2013 HURO/0901/147/2.2.2. Timisoara, January 26-27, **2012**.

Nagy, Z., **Németh, E.**, Gallé, Á., Csiszár, J., Erdei, L., Pécsváradi, A.: Changes in nitrogen metabolism of different wheat cultivars following Fusarium infection. HURO/0901/147/2.2.2 Szeged – Timișoara axis for the safe food and feed (SZETISA1) Hungary-Romania CrossBorder Cooperation Programme 2007-2013 Szeged, Hungary May 15-16, **2012**

*Publikáció (Konferenciakötet):*

Nagy Z., **Németh E.**, Gallé Á., Csiszár J., Erdei L., Pécsváradi A.: Changes in nitrogen metabolism of different wheat cultivars following Fusarium infection. Book of Final Riport HURO/0901/1472.2.2. Szeged – Timișoara axis for the safe food and feed SZETISA1, **2012**

**Németh, E.**, Nagy, Z., Benyó, D., Pécsváradi, A.,: Comparison of copper treated poplar (*Populus* sp.) clones. HUSRB/1002/214/036 Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees „OXIT” Book of Final Report, **2013**

*Absztrakt (Konferenciakiadvány)*

\***Németh, E.**, Bónus, L., Pécsváradi, A.: Binding of manganese to chloroplast glutamine synthetase and its effect on enzyme activity in wheat. FIBOK - Fıatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, **2018**

**Németh, E.**, Végh, B., Darkó, É., Majláth, I.: Impact of combined abiotic stress conditions on nitrogen metabolism of crop plants, A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa, Szeged, augusztus 30.-szeptember 1., **2017**

Majláth I, Darko E, Végh B, **Németh E.**, Nagy Z.: The response to moderate drought on the light utilisation of crop plants at suboptimal temperature, A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa, Szeged, augusztus 30.-szeptember 1., **2017**

**Németh, E.**, Nagy, Z., Benyó, D., Pécsváradi, A.: Comparison of copper treated poplar (*Populus* sp.) clones. HUSRB/1002/214/036 Oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, IPA OXIT Conference, Book of abstracts, Novi Sad, Serbia, **2013**

Nagy, Z., **Németh, E.**, Pécsváradi, A.: Separation of protein content of stressed poplar leaves by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. HUSRB/1002/214/036 „OXIT” Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, Programme and interim Conference, Book of abstracts, Szeged, **2012**

*Konferencián bemutatott poszterek:*

**Németh, E.**, Végh, B., Darkó, É., Majláth, I.: Impact of combined abiotic stress conditions on nitrogen metabolism of crop plants, A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa, Szeged, augusztus 30.-szeptember 1., **2017**

Majláth I, Darko E, Végh B, **Németh, E.**, Nagy Z.: The response to moderate drought on the light utilisation of crop plants at suboptimal temperature, A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa, Szeged, augusztus 30.-szeptember 1., **2017**

**Németh, E.**, Nagy, Z., Pécsváradi, A.: Copper treatment induced alterations in poplar leaf proteom. A Magyar Növénybiológiai Társaság XI. Kongresszusa, 2014. augusztus 27.–29., Szeged, Magyarország

Nagy, Z., Péter Szabó, K., **Németh, E.**, Pécsváradi, A.: Glutamine synthetase isoenzymes of *Nicotiana tabacum* callus of leaf origin, A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, Szeged, Magyarország, augusztus 31. – szeptember 2., **2011.**

## Nyilatkozat

Mint az alább felsorolt tudományos publikációk felelős szerzője hozzájárulok ahhoz, hogy **Németh Edit** a PhD fokozatszerzési eljárásában felhasználja azokat, első szerzőként, ill. társszerzőként.

\***Németh, E.**, Nagy Z., Pécsváradi, A.: Chloroplast glutamine synthetase, the key regulator of nitrogen metabolism in wheat, performs its role by fine regulation of enzyme activity via negative cooperativity of its subunits. *Frontiers in Plant Science* (9):191 (2018) DOI: 10.3389/fpls.2018.00191

\*Nagy, Z., **Németh, E.**, Guóth, A., Bona, L., Wodala, B., Pécsváradi, A.: Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 67:48-54 (2013) DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.03.001

Mindkét felhasználni kívánt publikációban, a kutatási eredmények elérésében, a kézirat elkészítésében a jelöltnek igen jelentős szerepe volt.

Szeged, 2018. május 24.



Dr. Pécsváradi Attila