

## ZÁRÓJELENTÉS (PD100504 Vezető kutató: Dr. Kolbert Zsuzsanna)

### Bevezetés, a projekt célja

A növények bámulatos adaptációs képességének egy példája a környezeti stressz hatására kialakuló fejlődési változások (stressz-indukált morfogenetikai válaszok, SIMV) megjelenése. A napjainkban aktuális problémaként jelentkező nehézfém (NF) terhelés SIMV fenotípust eredményezhet, mely kialakulásának háttérben hormonok és reaktív oxigénformák (ROS) részvételét feltételezik. *Jelen projekt keretében legfőbb célom az volt, hogy a reaktív nitrogénformák (RNF) gyökérnövekedési válaszok kialakulásában feltételezett szabályozó szerepét meghatározzam, és a nitrogén-monoxid (NO) hormonokkal és a ROS-kal való interakcióit kimutassam a NF stressz során bekövetkező növekedési válaszokban.*

### Alkalmazott kísérleti rendszer

Az *Arabidopsis thaliana* növények esetében réz (Cu), szelén (Se) valamint ólom (Pb) kezeléseket alkalmaztam. A réz terhelést 5, 25 és 50  $\mu\text{M}$  réz-szulfát, a szelén terhelést 10, 20 és 40  $\mu\text{M}$  nátrium-szelenit táptalajba való adásával alakítottam ki. Ólom kezelésként 25, 50 és 75  $\mu\text{M}$  ólom-nitrátot alkalmaztam. A vad típus mellett felhasználtam a *nox1* és a *gsnor1-3* NO-túltermelő mutánsokat (~kétszeres NO tartalom a vad-típushoz képest), valamint a *nia1nia2* és a *nia1nia2noa1-2* NO-hiányos mutánsokat (~40%-os NO tartalom). A *Brassica juncea* és *Brassica napus* növényeket tápoldatban kezeltem különböző réz (10, 25 és 50  $\mu\text{M}$  réz-szulfát), cink (50, 150 és 300  $\mu\text{M}$  cink-szulfát) valamint ólom (25, 50, 100  $\mu\text{M}$  ólom-nitrát) koncentrációkkal. Habár a cinkkezelést a kutatási tervben nem említettem, néhány elő kísérletet mégis elvégeztem, és az eredmények ígértesnek bizonyultak, ezért részletes vizsgálatokat folytattam ebben a rendszerben. A kutatási terv tartalmazza viszont a króm, mint nem-esszenciális nehézfém hatásainak vizsgálatát is. Ezeket a kezeléseket lúdfű növényen elvégezve nem találtam jelentős hatást a NO szintekre, ezért nem folytattam a kísérleteket ebben a rendszerben.

### Az eredmények ismertetése a munkatervnek megfelelően

A munkaterv kivitelezése 3 éves periódusban történt meg (2012. 01. 01. -2014. 12. 31.) és a program három egyenlő időszakra oszlott.

#### **A kutatási tervemben az első évben elvégzendő feladatokat négy pontban foglaltam össze.**

##### *1. A különböző nehézfémek hatására történő gyökérmorfológiai változások mikroszkópiás tanulmányozása.*

Rövidtávon (7 nap) a **réz** jelentősen csökkentette, hosszú távon azonban csak kis mértékben érintette a **lúdfű** főgyökér (FGY) megnyúlását. Néhány esetben a gyökérszörök a főgyökér csúcsához közelebb jelentek meg az elongációs és merisztematikus zóna redukciójának következtében. A szörök sűrűségét és hosszát is csökkentette a réz kitétség. Az iniciáció érzékenynek bizonyult, míg a későbbi oldalgyökér (OGY) fejlődés kevésbé volt érzékeny a réz többletre. A hosszú távú, 25  $\mu\text{M}$ -os kezelés hatására megnövekedett OGY számot, csökkent FGY hossz tapasztaltam, vagyis a SIMV megjelent (Kolbert és mts. 2012 PGR). Ez a gyökér fenotípus a csökkent levélméret kísérletében az akklimatizáció egyik alapeleme lehet, hiszen ezek a morfológiai változások hozzájárulhatnak a réz-terhelt növény jobb víz- és tápanyagellátásához. A vad típusal ellentétben a *nox1* és a *nia1nia2 noa1-2* mutáns nem mutatott réz-indukált FGY rövidülést, és a SIMV fenotípus sem jelent meg.

A **szelén-kezelt lúdfüvek** esetében a FGY hossz minden vizsgált időpontban (csírázás utáni 2., 4., 7. és 14. nap) csökkent, az OGY primordiumok és a kifejlett OGY-ek száma viszont a 14. napon megemelkedett az enyhe Se kitétség hatására. Vagyis ebben az időpontban a szelén-indukált SIMV fenotípus megjelenését tapasztaltam a gyökérrendszerben. A merisztéma mértének szelén-indukált csökkenése is kimutatható volt. A *gsnor1-3* mutáns a vad típusnál jelentősebb, míg a *nia1nia2* kisebb mértékű FGY rövidülést szenvedett el (Lehotai és mts. 2012 JXB).

A táptalajba jutott **ólom** csupán a legnagyobb koncentrációban (75  $\mu\text{M}$ ) csökkentette szignifikánsan a vad típusú **lúdfű** gyökérnövekedését, de az enyhébb terhelés (25  $\mu\text{M}$ ) OGY szám gyarapodást idézett elő. Vagyis a SIMV fenotípus legfőbb tünetét az oldalgyökeresedést a nem-esszenciális ólom is kiváltotta.

A **Brassica fajok** FGY hossza jelentősen csökkent minden **réz** koncentráció esetén, az oldalgyökerek száma azonban az enyhe réz stressz hatására megnövekedett, de csupán a rövidebb távú (7 napos) kezelés esetén. Vagyis ez esetben is a SIMV gyökér fenotípus megjelenése tapasztalható (Feigl és mts. 2013 EES).

A **cink** többlet hatására a *Brassica napus* FGY hossza csökkent, míg az OGY-ek száma gyarapodott az enyhe kitétség esetén. A *Brassica juncea* azonban nem szenvedett el FGY rövidülést, bár az OGY képződése fokozódott. Vagyis a cink-indukált SIMV 2 fő tünete együttesen csupán a *B. napus*-ban jelent meg (Feigl és mts. 2014 AOB).

Az **ólom** szintén jelentősen csökkentette a FGY hosszt mindkét fajban, de csak a *B. napus*-ban okozott oldalgyökeresedést.

Kísérletet tettem a „split-root” nevelési módszer beállítására, ez azonban csak részben bizonyult sikeresnek. Mivel úgy ítélt meg, hogy a rendszer optimalizálása időigényes, jelentősen megbonyolítja a munkát, és nem nyerhetők vele releváns új információk, így a továbbiakban eltekintettem a használatától.

## 2. A különböző nehézfémek RNF és ROS szintekre gyakorolt hatásainak mikroszkópos tanulmányozása.

A **lúdfű** szikleveleiben rövidtávon az 5  $\mu\text{M}$  **réz** szignifikánsan megemelte a NO szintet, míg a nagyobb fokú réz stressz nem okozott lényegi változást. Biokémiai (gátlószerek) és genetikai (mutánsok) vizsgálataim alapján arra következtettem, hogy a réz-indukált NO szintézishez az L-arginin-kapcsolt és a nitrát reduktáz (NR)-függő szintézisutak is hozzájárulnak. A NO képződése a kezeletlen gyökerekben szövetspecifikus jellegű volt, hiszen a megnyúlási zónában lényegesen nagyobb NO-függő fluoreszcens jelet detektáltam a merisztémához képest. Hét napos réz terhelés hatására az elongációs zóna jelentős NO tartalma koncentrációfüggő módon csökkent (ennek hátterében nem a szuperoxiddal történő reakció áll), míg hosszú távon a NO szintje szignifikánsan megemelkedett (NR-függő módon) a megnyúlási zóna sejtjeiben (Kolbert és mts. 2012 PGR). Vagyis a réz többlet hatása a NO metabolizmusra függ a terheltség időtartamától. Az OGY-k NO tartalmát a réz kezelése nem befolyásolták. A NO fokozhatja a réz érzékenységet vagy elősegítheti a toleranciát is a réz stressz erősségétől függően. A RNF-ROS interakciókat mutánsok (NO homeosztázis mutánsok: *nox1*, *gsnor1-3*, *nia1nia2*; ROS homeosztázis mutánsok: *vtc2-1*, *vtc2-3*, *miox4*) segítségével tanulmányoztam. Antagonisztikus kapcsolatot találtam a RNF és ROS között, hiszen a lúdfű gyökerekben a magas NO tartalomhoz alacsony ROS tartalom társult és fordítva. Összességében a súlyosabb réz kitettség esetén a NO enyhítő hatása a ROS metabolizmus szabályozásán keresztül valósul meg (Pető és mts. 2013 PCR).

A csíranövények korai fejlődése során a NO szintje csökkent (ez NR-független), a hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) tartalom viszont emelkedett a gyökerekben, ami a két jelmolekula közötti antagonista kapcsolatra utal **szelén stressz** során. A *gsnor1-3* mutáns magas NO szintje valamint a vad típusú növény NO donorral történő kezelése fokozta a Se túrást, míg a csökkent NO tartalom a *nia1nia2* növényekben érzékenységet eredményezett (Lehotai és mts. 2012 JXB).

Az **ólom** koncentráció-függő módon megnövelte a NO tartalmát a FGY és az OGY merisztémájában és megnyúlási zónájában, vagyis a teljes gyökérzetben.

A **Brassica** gyökerekben a NO és a peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) metabolizmusa a **réz** kezelés időtartamától és koncentrációjától függően megváltozott. A szuperoxid gyökönion és a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szintek mindkét fajban növekedtek a réz stressz hatására (Feigl és mts. 2013 EES).

A **cink** többlet csupán a *B. napus* gyökérzetében váltott ki szuperoxid és  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődést, míg a NO és  $\text{ONOO}^-$  szintek mindkét fajban szignifikáns módon megemelkedtek (Feigl és mts. 2014 AOB).

Az **ólom** nem okozott szignifikáns változásokat ezen molekulák szintjében a *Brassica* gyökerekben.

## 3. Az antioxidáns védekező rendszer enzimatis és nem enzimatis komponenseinek vizsgálata

A lúdfű növények gyökérzete nem biztosított elegendő biomasszát, ezért ezeket a vizsgálatokat csak *Brassica* növények gyökérzetében végeztem el. A **réz** hatására a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása fokozódott, az aszkorbát peroxidáz (APX) aktivitása pedig csökkent. Az oxidált aszkorbát mennyisége jelentősen megnőtt, míg a hosszabb távú stressz hatására a redukált forma is felhalmozódott. A redukált forma arányának réz-indukált csökkenése mindkét fajban jellemző volt (Feigl és mts. 2013 EES).

A **cink terhelés** fokozta a SOD és csökkentette az APX aktivitást, ez utóbbi azonban csak a *B. napus*-ban volt kimutatható (Feigl és mts. 2014 AOB).

Meghatároztam továbbá a kataláz, glutation-reduktáz aktivitásokat és a GSH:GSSG arányt is a réz illetve cink-kezelt *Brassica* növényekben, ezek az eredmények azonban változatos képet mutattak, és helyenként nehezen magyarázhatóak voltak.

## 4. Az NF stressz által kiváltott membránkárosodás és sejthalál vizsgálata a gyökerekben

A **réz** terhelésnek kitett, vad típusú **lúdfű** növények gyökércsúcsában detektálható volt a lipid peroxidok felhalmozódása Schiff-festéssel. A merisztéma sejtek életképessége (fluoreszcein diacetát festéssel meghatározva) csak az 50  $\mu\text{M}$  réz hatására csökkent szignifikánsan. Az életképesség csökkenéséből pedig következtethetünk a sejthalál mértékére. A NO többlettel bíró mutánsok (*nox1* és *gsnor1-3*) és a *nia1nia2noal-2* merisztémája az alacsony réz koncentrációra reagált érzékenyen, míg a súlyosabb stressz nem okozott életképesség vesztést az esetükben. A *nia1nia2* minden réz koncentráció esetén jelentős életképesség vesztést szenvedett el. A vad típusú növények NO donorral való kezelése megakadályozta az életképesség réz indukálta csökkenését, míg a gyökfogyó súlyosbította azt az enyhébb stresszek esetén (Pető és mts. 2013 PCR).

A **szelén** csupán a legnagyobb koncentrációban csökkentette az életképességet a vad típusú **lúdfű** gyökerekben. Ehhez képest a *gsnor1-3* ellenállóbbnak, a *nia1nia2* pedig érzékenyebbnek bizonyult. A vad típusú növények NO donorral való kezelése pedig enyhítette a szelén-indukált életképesség vesztést (Lehotai és mts. 2012 JXB).

A **rézkezelt *Brassica*** növények főgyökérc súcsaiban a jelentős életképesség csökkenés történt minden koncentráció esetén. Mindkét fajban kimutatható volt a lipid peroxidáció a Schiff-festéssel, de a színreakció a *B. juncea* gyökereiben bizonyult kifejezettebbnek (Feigl és mts. 2013 EES).

A **cink** többlet csak a *B. napus* merisztémájában okozott életképesség csökkenést, és a lipid peroxidáció is ennek a fajnak a gyökércsúcsában volt detektálható a festéssel (Feigl és mts. 2014 AOB).

**Módszerek:** fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok, spektrofotometriás vizsgálatok

**Várható eredmények:** a NF-indukált SIMV mértékének, idő- és koncentrációfüggésének meghatározása a vad típusú és mutáns gyökerekben, és ennek összefüggése a RNF és ROS szintekben bekövetkező változásokkal. Összefüggés kimutatása a ROS szintek változása és az antioxidáns rendszer aktivitása között. Lehetséges kapcsolatok feltárása a reaktív nitrogén- és oxigénformák között.

Megállapítottam, hogy a SIMV megjelenése nem faj-, és elemfüggő, de függ a stressz erősségétől és a kitétség időtartamától. Általában alacsony koncentrációjú és hosszabb időtartamú kitétség esetén jelenik meg a SIMV fenotípus. A SIMV-et mutató gyökérzet -minden általam vizsgált elem és növényfaj esetén- megnövekedett NO tartalommal bír a SIMV-et nem mutató gyökérzethez képest. *Brassica* fajokban összefüggést találtam a SOD és az APX aktivitások és a ROS szintek változásai között. A lúdfűvel kapott eredményeim a NO és a ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) közötti antagonistá kapcsolatra utalnak réz és szelén kitétség esetén is.

**Közlés:** nemzetközi konferencia összefoglalók (XVIII. FESPB Konferencia, 4. Nemzetközi „Plant NO Club”) és kéziratok előkészítése nemzetközi folyóiratban való közlésre.

A fent említett kongresszusok helyett költséghatékonyabb és jobban profilba vágó konferenciákat látogattam meg. Részt vettem a „COST ACTION FA 0905 - Mineral improved crop production for healthy food and feed” elnevezésű konferencián Lisszabonban 2012. október 23-26. között.

A bemutatott előadás címe: THE EFFECT OF ZINC ON THE MICROELEMENT HOMEOSTASIS AND THE METABOLISM OF REACTIVE SIGNAL MOLECULES IN BRASSICA JUNCEA AND BRASSICA NAPUS

Szerzők: Gábor Feigl, Devanand Kumar, Andrea Pető, Nóra Lehotai, Attila Ördög, Árpád Molnár, Zsuzsanna Kolbert, László Erdei

Eredményeim szerepeltek továbbá poszter bemutató formájában a „7<sup>th</sup> SPPS PhD Student Conference” elnevezésű konferencián, amit 2012. szeptember 12-15. között rendeztek meg Észtországban.

A poszter címe: STUDY OF SELENITE-INDUCED HORMONAL AND SIGNALLING MECHANISMS DURING ROOT GROWTH OF *ARABIDOPSIS THALIANA* L. BY LIGHT- AND FLUORESCENCE MICROSCOPY

Szerzők: Nóra Lehotai, Andrea Pető, Gábor Feigl, Devanand Kumar, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert

A 2012-es évben három kéziratom került elfogadásra, és jelent meg nyomtatásban (lásd publikációk).

**A kutatási tervemben a második évben elvégzendő feladatokat négy pontban foglaltam össze.**

1. *A GSNO immunfluoreszcenciás, valamint az RSNO fluoreszcens mikroszkópos kimutatása.*

Az S-nitrozoglutation (GSNO) immunfluoreszcenciás detektálási módszer adaptálása során számos technikai akadállyal szembesültem (pl. metszeteket minősége, antitestek hígítása, inkubációs idők hossza), és végül nem sikerült értékelhető felvételeket készítenem. Ezért egy másik módszert, az LC-ESI MS technikát alkalmaztam, mely segítségével meg tudtam mérni, és nmol/g friss tömeg egységben ki tudtam fejezni a GSNO koncentrációját a cinkkezelésnek kitétt *Brassica* fajokban. A levélben ez megemelkedett, a gyökérben azonban jelentősen lecsökkent a cink kezelés hatására mindkét fajban. Az RSNO-specifikus fluoreszcens festéket (Alexa Fluor 488 Hg-link phenylmercury) sajnálatos módon kivonták a forgalomból, így az ezzel tervezett kísérleteket nem állt módomban elvégezni. Annak kiderítésére, hogy S-nitrozilációs események történnek-e a lúdfű gyökerében réz kezelés hatására, egy biokémiai eljárást alkalmaztam a festés helyettesítésére. Az N-etil-maleimid (NEM) hatékonyan gátolja az S-nitrozilációs reakciót, ezért a réz kezelés mellett alkalmazva vad típusú növényekben az életképesség szignifikáns csökkenését tapasztaltam a csak rézzel kezelt növényekhez képest. Ebből arra következtetek, hogy réz stressz hatására S-nitroziláció történik, és a NO ilyen, nitrozilációs reakciókon keresztül járul hozzá a réz tűrés kialakulásához.

2. *A mikro- és makroelemek koncentrációjának meghatározása a NF-kezelt Brassica és lúdfű levél és gyökérszövetekben.*

A makroelemek közül a Ca, K és Mg koncentrációját mértem meg cink-kezelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* hajtásában és gyökerében. A K ion koncentrációjában nem okozott lényeges változást a cinkkezelés, míg a Ca és a Mg tartalom nőtt, azonban csak a hosszú távú cinkkezelésnek kitétt növények hajtásában. A fajok között nem volt lényeges eltérés, csak úgy, mint a réz-kezelt *Arabidopsis* esetében sem, ahol a makroelemek koncentrációjában bekövetkező változások nem bizonyultak szignifikánsnak.

A következő mikroelemek meghatározása történt meg ICP-MS technika segítségével: Cu, Zn, Mn, Fe, B, Mo, Co, Ni, Se, Al.

Az *Arabidopsis* esetén a kontroll növényekben a gyökér mutatott nagyobb réz tartalmat, míg a külső réz kezelés hatására a hajtásban volt magasabb az akkumuláció. A hajtásban csökkent, a gyökérben viszont jelentősen nőtt a vas koncentráció, vagyis a réz terhelés nagymértékben módosította a fém növényen belüli eloszlását. A réz stressz csökkentette a cink tartalmat, és ez leginkább a gyökérben volt jellemző (Pető és mts. 2013 PCR).

A **szelén kezelés a lúdfüvek esetén** szignifikáns (kb. 90-szeres) szelén koncentráció növekedést okozott a gyökérben és a hajtásban is (Lehotai és mts. 2012 JXB). Nem történt szignifikáns változás a vizsgált mikroelemek (Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, B, Mo, Co) koncentrációiban egyik szervben sem.

**Réz kezelésnek kitett Brassica fajokban** az elemek koncentrációjának meghatározásán kívül hajtás:gyökér arányt és bioakkumulációs faktort (BAF) is számítottam. Az előbbi az elemek szervek közötti eloszlását, míg az utóbbi a növények fémakkumuláló képességét, azaz fitoremediációra való alkalmazhatóságát mutatja meg. Mindkét *Brassica* faj hasonló réz akkumulációt mutatott. Mindkét fajban a rézre vonatkozó BAF a gyökérben nagyobb volt, mint a hajtásban. A Zn, Fe, Mn és Co koncentrációk jelentősen csökkentek, de a hatás nem függött a réz kezelés erősségétől. A réz többlete negatívan befolyásolta a gyökér és a hajtás Zn, Mn és Co tartalmát. Általánosságban elmondható, hogy ezt az elem eloszlási mintázatot a réz kitettség nem befolyásolta jelentősen (Feigl és mts. 2013 EES).

A **cink** terhelésnek kitett *Brassica* fajok esetében kiemelendő, hogy a Cu koncentráció nőtt, a Fe, Mn és a Co tartalom pedig csökkent mindkét szervben. A fajok között lényeges eltérést nem tapasztaltam (Feigl és mts. 2014 AOB).

Az **ólom** a *Brassica* fajok gyökerében nagymértékben felhalmozódott, de a hajtásból szinte teljesen kizáródott.

### 3. Western blot technika adaptálása és alkalmazásának kidolgozása a tirozin nitrációval módosuló fehérjék vizsgálatára a NF-kezelt *Brassica* és *Arabidopsis* növényekben.

Elő kísérleteim során a kereskedelmi forgalomban kapható elsődleges (anti-nitrotyrosine antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich) és az azzal kompatibilis másodlagos antitesttel (anti-rabbit IgG (whole molecule)–peroxidase antibody produced in goat, Sigma-Aldrich) dolgoztam. Az előhívást Clarity Western ECL szubsztráttal (BioRad) végeztem kemilumineszcencia-alapon működő módszerrel. A klasszikus röntgenfilmes és digitális technikát is alkalmaztam. Több elsődleges antitest-hígítást kipróbáltam az 1:300-tól az 1:8000-ig. Az eredményeimből az látszik, hogy cink hatására széles körű fehérje nitráció történik a *Brassica* fajokban, vagyis a nitrációt elszenvedett fehérjék azonosítása sikeres volt. A kapott mintázat részletesebb elemzésére megfelelő technikát kellett találnom a pályázat utolsó évében.

### 4. A kiválasztott gének RT-PCR analízisének elkezdése. A gének cDNS szekvenciáinak keresése adatbázisokban (EMBL/GenBank/DDBJ).

A vizsgálni kívánt gének kiválasztása irodalmi adatok alapján megtörtént. Ezek cDNS szekvenciáit az említett adatbázisokban megkerestem. A tényleges kísérletek a pályázat utolsó évének februárjában kezdődtek.

**Módszerek:** Fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok Zeiss Axiowert 200M típusú mikroszkóppal. A mikro- és makroelemek koncentrációjának meghatározása.

A GSNO meghatározásához nem immunfluoreszcens módszert alkalmaztam, hanem LC-ESI-MS technikával helyettesíttem azt. Az RSNO detektálására alkalmas fluoreszcens festéket nem tudtam megvásárolni (kivonták a forgalomból), így egy biokémiai kezelést (N-etil-maleimid) alkalmaztam, ami közvetett bizonyítékkal szolgált az S-nitrozilációs események megtörténtére. Az elemtartalmakat ICP-MS (Thermo Scientific Xseries II) készülékkel határoztam meg.

**Várható eredmények:** az egyes NF kezelések esetén a GSNO szintekben bekövetkező változások valamint az S-nitrozilációs reakciók meghatározása. A NF terhelés által az elemtartalomban okozott változások kimutatása.

A cink kezelés esetén a GSNO koncentrációjában bekövetkező változásokat sikerült kimutatnom. Biokémiai módszerrel meghatároztam, hogy a réz stressz hatására S-nitroziláció történik, és a NO ilyen, nitrozilációs reakciókon keresztül járul hozzá a réz tűrés kialakulásához. A makro- és mikroelemek koncentrációiban bekövetkező változásokat, vad-típusú *Arabidopsis*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* gyökér és hajtásrendszerében sikerült meghatároznom.

**Közlés:** hazai és nemzetközi konferencia összefoglalók (Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 11<sup>th</sup> International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants) és publikáció nemzetközi folyóiratban.

A Magyar Növénybiológiai Társaság Kongresszusát 2014-ben rendezték. A 2013-as évben egy helyi rendezésű konferencián (Biomedica Konferencia, 2013. 12. 13., Szeged) vettem részt, ahol posztert mutattam be.

Cím: RELATIONSHIP BETWEEN CYTOKININ AND NITRIC OXIDE IN SELENIUM-TREATED ARABIDOPSIS PLANTS

Szerzők: Nóra Lehotai, Gábor Feigl, Ágnes Koós, Andrea Pető, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert

Részt vettem a „11<sup>th</sup> International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants” elnevezésű kongresszuson, ami Varsóban került megrendezésre 2013. július 17-19. között.

A bemutatott poszterem címe: CYTOKININ OVERPRODUCING IPT-161 ARABIDOPSIS SHOWS ALTERED NO GENERATION AND INSENSITIVITY TO SELENITE

Szerzők: Zsuzsanna Kolbert, Nóra Lehotai, Andrea Pető, Gábor Feigl, Nóra Tugyi, László Erdei

A 2013-as évben két kéziratom került elfogadásra, és jelent meg nyomtatásban nemzetközi folyóiratokban (lásd publikációk).

### **A kutatási tervemben a harmadik évben elvégezendő feladatokat három pontban foglaltam össze.**

#### *1. Tirozin nitráció kimutatása Western blot technikával.*

A táptalajon nevelt vad típusú és (sok esetben törpe) mutáns lúdfüvekből nem sikerült elegendő biomasszát nyernem a fehérjetisztításhoz és a Western blot analízishez, ezért ezeket a vizsgálatokat csak *Brassica* növényekben végeztem el.

A módszer adaptálását és optimalizálását a pályázat 2. évében elvégeztem. Kontroll és cinkkezelésnek kitett *Brassica juncea* és *Brassica napus* leveléből valamint gyökeréből fehérjekivonatokat készítettem. Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) segítségével szeparáltam a fehérjéket majd ezeket polivinilidén (PVDF) membránra vittem fel, és 3-nitrotirozin elleni poliklonális antitesttel (Sigma-Aldrich) reagáltattam. Kísérleteim során a kereskedelmi forgalomban kapható elsődleges (anti-nitrotyrosine antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, 1:2000) és az azzal kompatibilis másodlagos antitesttel (anti-rabbit IgG (whole molecule)–peroxidase antibody produced in goat, Sigma-Aldrich, 1:10 000) dolgoztam. Az előhívást Clarity Western ECL szubsztráttal (BioRad) végeztem kemilumineszcencia-alapon működő módszerrel. A klasszikus röntgenfilmes és digitális technikát is alkalmaztam. A fehérjekivonat tisztításához immunoprecipitációs eljárást alkalmaztam mágneses gyöngyök felületére kovalensen kötött fehérje antitest segítségével (Thermo Scientific Pierce Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit). Pozitív kontrollként nitrált marha szérum albumint használtam.

A kontroll növények szerveiben is történt nitráció, vagyis egy alapvető fehérjeaktivitás szabályozással állunk szemben. Cink többlet hatására ugyanazok a fehérjesávok mutattak immunopozitivitást, de a reakció erősebb volt, vagyis a nitráció fokozódott mindkét *Brassica* fajban. Elsőként mutattam ki nehézfém-kezelt növényben a fehérje nitráció fokozódását, ami fontos információkkal szolgálhat a *Brassica* fajok cink tűrésével kapcsolatban (Feigl és mts. 2014 AOB).

#### *2. A kiválasztott gének expressziós mintázatainak RT-PCR analízise*

A cinkkezelt *Brassica* fajok gyökérnövekedési válaszaik között különbséget találtam, ezért ebben a rendszerben tanulmányoztam különböző ciklin (CYC) és ciklin-dependens kináz (CDK) gének expresszióját.

Irodalmi adatok alapján a következő *Brassica* géneket választottam ki: *Brassica napus* CDKA (U18365), CYCA2;3 (L25405.1), CYCA1;1 (L25406.1). A további géneket szekvencia homológia alapján választottam ki ismert, publikált gének alapján: CYCD4;1 (TC195684), KRP1 v. 2 (TC 210298).

Ezek cDNS szekvenciáit az NCBI adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) megkerestem, és primereket terveztem a Primer 3 szoftver (<http://primer3.ut.ee/>) segítségével. A tesztelés után a megfelelő olvadási görbéjű és hatékonyságú primereket használtam fel. A *Brassica* gyökérmintákból RNS-t izoláltam és DNáz kezelés után cDNS-t hoztam létre. A minták tesztelése után qRT-PCR-rel meghatároztam a génexpressziós változásokat (SYBR Green festék segítségével). Referencia génként a 18S riboszómális RNS-t és a GAPD géneket választottam, melyek konstitutív kifejeződést mutattak cinkkezelésre. A relatív transzkriptszint változásokat a 2<sup>(-ΔΔCt)</sup> képlettel kalkuláltam. A *B. juncea* kontroll mintában mért ΔCt értékeket vettem a génexpresszió egységének.

A CDKA expressziója a *B. napus* gyökérzetében csökkent a cink terhelés hatására, míg a *B. juncea* esetében csökkenés nem, de kismértékű indukció volt megfigyelhető az 50 és a 150 μM cink hatására. A CYCA1;1, CYCA2;1 és a CYCD4;1 gének kifejeződése nem mutatott érdemi változást a cink kezelése hatására egyik fajban sem. A CDK aktivitás specifikus gátlójaként, így a sejtciklus negatív regulátoraként szereplő KRP gén kifejeződése nagyfokú (~100-szoros) indukciót mutatott minden cinkkezelésre *B. napusban*, és 300 μM cinkre *B. juncea*-ban. A gyökérnövekedés gátlása a cink kezelt *B. napus*-ban részben magyarázható a CDKA kifejeződés gátlásával és a negatív regulátor KRP indukciójával. A *B. juncea*-ban a gyökérnövekedés gátlásának elmaradását pedig részben magyarázhatja az, hogy a cink terhelés nem csökkentette a CDKA, de növelte a KRP expressziót.

3. Az auxin, citokinin és etilén eloszlásának *in situ* vizsgálata DR5::*GUS*, ARR5::*GUS* és ACS::*GUS/GFP* lúdfű riporter vonalak segítségével.

A rövidebb távú réz terhelés az auxin szintet jelző DR5::*GUS* promóter aktivitás növekedését okozta a lúdfű mindkét szervében, míg a hosszú távú kísérletekben az auxin szint lényeges csökkenését tapasztaltam a lúdfű levelekben, a gyökércsúcsban és a különböző fejlettségű oldalgyökerekben (Kolbert és mts. 2012 PGR).

Az auxin transzport gátlószerét alkalmazva megállapítottam, hogy az auxin a NO szintek negatív regulátora réz stressz alatt a főgyökérben. Továbbá a DR5::*GUS* növényeket NO donor (SNP) és gyökfagó (cPTIO) molekulákkal kezeltem, és míg az első esetben az auxin jel csökkenését, addig a gyökfagó alkalmazásával annak erősödését tapasztaltam mindkét szervben. Ez az auxin és a NO között meglévő kölcsönösen negatív szabályozó kapcsolat meglétére utal réz stressz alatt.

A szelén csökkentette a FGY csúcsban a DR5::*GUS* aktivitást, azonban jelentősen növelte a citokinin szintet jelző ARR5::*GUS* jelet valamint az etilén szintézisét (ACS8::*GUS*) (Lehotai és mts. 2012 JXB). A citokinin (CK)-függő ARR5::*GUS* promóter aktivitás változásait részletesebben is megvizsgáltam szelén terhelt lúdfűben. A citokinin jel fokozódását a gyökérben, a jel erőteljes csökkenése kísérte a sziklevelekben, ami a citokininek gyökér-hajtás transzkolációjának gátlására utal szelén stressz alatt. A CK túltermelő lúdfű mutáns (*ipt-161*) csökkent NO szinttel rendelkezett és a kontroll ARR5::*GUS* lúdfű NO donorral való kezelése a CK jel eliminációjához vezetett a merisztémában, ami arra utal, hogy kölcsönösen negatív interakció áll fenn a CK és a NO között a kezelést nem kapott növények gyökérzetében. Szelén stressz alatt a NO donor megakadályozta a CK akkumulációt a gyökércsúcsban, ami a NO CK szintekre gyakorolt negatív hatását feltételezi.

A PIN auxin transzport fehérjék expressziójában bekövetkező réz-indukált változásokat Yuan és mts. (2013, *Plant Cell Physiol* 54:766-778) publikálták, ezért ilyen irányú vizsgálatokat ebben a rendszerben nem végeztem. Szelén hatására jelentős változásokat a PIN1::*GFP* expressziójában nem sikerült detektálnom.

**Módszerek:** *In situ* molekuláris biológiai vizsgálatok Zeiss Axiowert 200M típusú mikroszkóppal. Génexpressziós vizsgálatok qRT-PCR (Biorad) készülékekkel.

**Várható eredmények:** a NF-ek hatására bekövetkező fehérje nitráció kimutatása, valamint az egyes hormonok eloszlásában és szintjében bekövetkező változások *in situ* detektálása. Az NF-szabályozott RNF és ROS szintek hormon eloszlásra és transzportra gyakorolt hatásának meghatározása. A sejtciklus gének expressziójában bekövetkező NF-indukált módosulások kimutatása, a RNF génextpresszióra gyakorolt hatásának felderítése. A kapott eredmények jelátviteli modellben való felvázolása annak érdekében, hogy egy átfogó képet kapjunk a RNF szerepéről és az egyéb jelátviteli komponensekkel való kölcsönhatásáról a NF stressz hatására kialakuló SIMV során.

Sikeresen kimutattam a cink hatására a *Brassica* fajok gyökérzetében bekövetkező fehérje nitráció fokozódását. Lúdfű gyökerekben detektáltam az auxin, citokinin és etilén eloszlásának megváltozását, amit összefüggésbe hoztam a tapasztalt növekedési válaszokkal. Kimutattam a NO negatív szabályozó hatását az auxin és citokinin szintekre réz illetve szelén stressz során. A *Brassica* gyökérzetben meghatároztam a ciklin-függő kináz és a negatív regulátor KRP kifejeződésének cink-indukált változásait és lehetséges összefüggését a növekedési válaszokkal.

**Közlés:** nemzetközi folyóiratcikk, zárójelentés

A 2014-es évben két Ph.D. értekezés készült és három kézirat készült az eredményekből. Ezek közül egy kézirat elfogadásra került és megjelent on-line (lásd publikációk). Egy másik kézirat elfogadásra került az *Acta Biologica Hungarica* folyóiratban, a megjelenés a 2015-ös évben várható (lásd lentebb). A harmadik kézirat benyújtásra került a *Plant Growth Regulation* folyóiratba, bírálata folyamatban van (lásd lentebb).

Elfogadott kézirat címe: COMPARING THE EFFECTS OF EXCESS COPPER IN THE LEAVES OF BRASSICA JUNCEA (L. CZERN) AND BRASSICA NAPUS (L.) SEEDLINGS: GROWTH INHIBITION, OXIDATIVE STRESS AND PHOTOSYNTHETIC DAMAGE

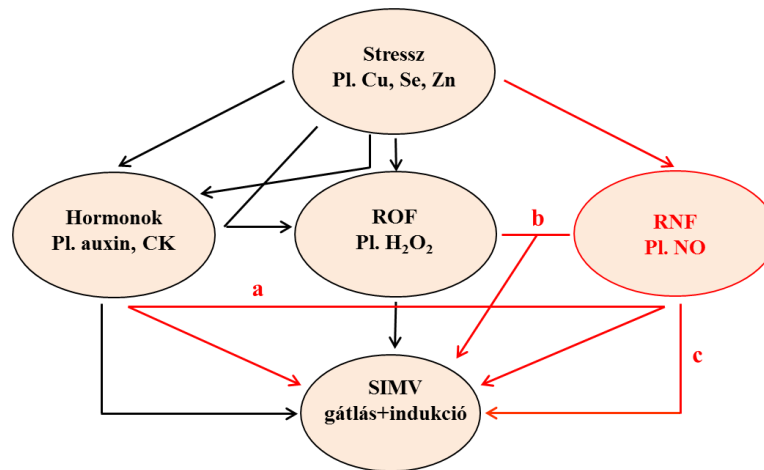
Szerzők: Gábor Feigl, Devanand Kumar, Nóra Lehotai, Andrea Pető, Árpád Molnár, Éva Rácz, Attila Ördög, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert, Gábor Laskay

Benyújtott kézirat címe: COPPER SENSITIVITY OF NIA1NIA2NOA1-2 MUTANT IS ASSOCIATED WITH ITS LOW NITRIC OXIDE (NO) LEVEL

Szerzők: Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, Nóra Lehotai, Gábor Feigl, László Erdei

## Összefoglalás

A több, különböző növényfaj (lúdfű, olajrepcse, mustár) bevonása a kísérletekbe és ezek különböző nehézfémekre (réz, szelén, cink, ólom) adott válaszainak tanulmányozása lehetővé tette általános következtetések levonását a stressz-indukált morfogenetikai válasz tulajdonságait illetően. Megállapítottam, hogy a gyökérszet SIMV fenotípusának megjelenése nem faj-, és elemfüggő, de függ a stressz erősségétől és a kitétség időtartamától. Általában alacsony koncentrációjú és hosszabb időtartamú kitétség esetén jelenik meg, és a SIMV-et mutató gyökérszet megemelkedett NO tartalommal rendelkezik. További eredményeim bizonyították a NO részvételét, hormonokkal és ROS-kal való interakcióit a növekedési válaszok során. A pályázat eredményeit irodalmi adatokkal kiegészítve egy összefoglaló jelátviteli modellben szemléltetem.



A SIMV jelátvitelének ismert elemei (fekete vonallal, Potters és mts. 2009, Plant Cell Environ 32:158-169 nyomán) és a RNF (NO) -eredményeim alapján feltételezett- részvétele a jelátvitelben (piros vonallal).

Rendelkezünk arra vonatkozó ismeretekkel, hogy a környezeti stresszek során megváltozik a hormon metabolizmus és/vagy transzport, valamint a ROS (vagy ROF) homeosztázis. Ezek egymástól függetlenül, de kölcsönhatásban is hozzájárulnak a növekedés megváltozásához stressz hatás alatt. A pályázati munka eredményeként kiderült, hogy a RNF (legfőképp a NO) szerepelnek a stressz-indukált növekedés szabályozásában. Feltételezésem szerint legalább három NO jelátviteli út lehetséges: a) hormon-függő NO hatás (pl. sejtciklus gének szabályozása), b) ROS (ROF)-függő NO hatás (pl. fehérje nitráció), c) direkt, az előzőektől független hatás (pl. génexpresszió szabályozás fehérje S-nitroziláció által).

Bár jelen pályázat keretében néhány NO jelátviteli folyamatra fény derült, a munka további izgalmas kérdéseket vet fel, amik megválaszolásához a jövőben is kitartó kutatómunka szükséges.