

Zárójelentés

Szakmai beszámoló

a „Növényi elektrofiziológiai mérések alkalmazása a NO és az alacsony extracelluláris kálium tartalom sztómaműködésben betöltött szerepének feltárásában”

című, 48787 azonosítójú ifjúsági OTKA pályázatról.

Témavezető: Dr. Horváth Ferenc
egyetemi adjunktus
SZTE Növénybiológiai Tanszék

2009. február 23.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
3. Eredmények.....	5
3.1 KAT1 inaktiváció alacsony extracelluláris kálium koncentráció mellett	5
Összefoglalás.....	5
3.2 Az abszcizinsav hatására szintetizálódó NO sztómazáródásban betöltött szerepének vizsgálata. A NO hatása KAT1 homotetramer ioncsatornára	6
Összefoglalás.....	6
Bevezetés.....	6
Anyagok és módszerek.....	7
Eredmények.....	10
3.3 A NO in vivo támadáspontjai a fotoszintetikus elektrontranszportláncban - Klorofill fluoreszcencia indukciós mérések borsó leveleken.....	14
Összefoglalás.....	14
3.4 A NO gátolja a zárósejtek fotoszintézisét	15
Összefoglalás.....	15
Bevezetés.....	15
Anyagok és módszerek.....	16
Eredmények.....	17
4. Összefoglalás.....	21
Irodalmi hivatkozások.....	22

1. Bevezetés

Ifjúsági OTKA pályázatom kutatási célja a növényi zárósejtek működésének és szabályozásának mélyebb megértése volt, különös tekintettel a nitrogén monoxid (NO)-függő sztómazáródási út elemeire és az alacsony extracelluláris kálium koncentráció melletti működés fiziológiájára. Ez utóbbi esetben egy nemzetközi együttműködésben végzett kutatásról volt szó, melyben partnerem a Darmstadti Műszaki Egyetem Membrán-biofizikai Tanszéke volt. Együttműködésünk több korábbi kutatáson alapult, melyek közül a legfontosabbak a zárósejtek kifelé egyenirányító kálium csatornáinak foszforilációjával (Horvath és mtsai., 2002), és az eddig felfedezett legkisebb kálium csatorna, a virális eredetű Kcv transzporter struktúra-funkció kapcsolatának feltárásával foglalkoztak (Moroni és mtsai., 2002).

A pályázatomban a következő kérdésekre kerestem a választ:

- 1, Magasabb citoszolikus NO koncentráció (>100 nM) módosítja-e a kifelé egyenirányító kálium csatorna (GORK) kapuzási tulajdonságait idegen expressziós rendszerben?
- 2, Ha igen, akkor ez a pH-tól függő csatornaszabályozás része, vagy a NO közvetlenül, a csatornafehérje S-nitrozilációján keresztül hat?
- 3, A befelé egyenirányító K-csatorna (KAT1) aktivitását a NO a citoszolikus Ca-szint emelésén keresztül gyengíti. Mivel idegen expressziós rendszerben ez a folyamat kelátképzőkkel könnyebben eliminálható, meg kívántam vizsgálni, mérhető-e közvetlen NO hatás az ioncsatornára?
- 4, Vajon hat-e a NO a zárósejt foszforilációs-defoszforilációs homeosztázisára?
- 5, A zárósejtek citoszolikus NO szintje nehézfémstressz hatására gyorsan emelkedik. A gyors NO szintézis újabb jelentést adhat a sztómazáródás szabályozásának.
- 6, Vajon tapasztalható-e egyéb NO hatás a plazmamembrán és a tonoplaszt transzportereire?
- 7, Meg kívántam állapítani, hogy alacsony extracelluláris kálium koncentráció mellett, és más egyértékű, ioncsatornán át nem diffundáló ionok jelenlétében a KAT1 és GORK csatornák hogyan viselkednek?
- 8, Vajon az újabb eredmények és reguláló utak hogyan építhetők be a sztómazáródási mechanizmust szabályozó lépések közé?

A kérdések megválaszolásához rendelkezésemre állt az a műszerpark, mellyel a transzport folyamatok elemi eseményei, a nyitódó ioncsatornák pikoamper nagyságú áramai mérhetővé váltak. A pályázatban tervezett beruházást az első évben megvalósítottam: a patch clamp mérésekhez a pneumatikus rezgésmentes asztalt megvásároltam. Rendelkeztem továbbá azzal a molekuláris háttérrel, amellyel az egyes csatornagének idegen expressziós rendszerbe transzfektálhatók, így azok az eredeti szabályozási környezetből kiragadva vizsgálhatók. Eredményeinket egy nemzetközi (Hertel és mtsai., 2005) folyóiratban és két magyar konferencián mutattuk be (Horvath, 2007; Ordog és mtsai., 2008). A zárósejtek befelé egyenirányító AtKC1, AKT1, AKT2/3 csatornáinak génjeit a Szegedi Biológiai Központ Arabidopsis Molekuláris Biológiai Csoportjával együttműködve izoláltuk. Az ezekkel a csatornákkal kapcsolatos kísérletek még folynak, eredményeinket várhatóan két éven belül publikáljuk.

Mivel a zárósejt-kutatás, és ezen belül a membrántranszport és jelátvitel vizsgálata igen „forró” területeknek számítanak, több kérdést más kutatócsoportok velünk párhuzamosan megválasztak. E kérdések a zárósejt NO-függő foszforilációs-defoszforilációs homeosztázisával (Sokolovski és mtsai., 2005) és a kifelé egyenirányító ioncsatornák (GORK) NO-szabályozásával kapcsolatosak.

Mindazonáltal az eltelt négy év alatt nemcsak az előzetes kutatási terv feladatait, de a NO-függés kapcsán a fotoszintetikus elektrontranszportot, ezen belül a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását is megvizsgáltam. A kapott eredményeket egy magyar (Wodala és Horvath, 2008) és egy nemzetközi folyóiratban (Wodala és mtsai., 2008) publikáltuk, illetve két nemzetközi konferencián mutattuk be (Közép-európai Fotoszintézis Konferencia, Brno, 2005; FESPB Kongresszus, Lyon, 2006).

3. Eredmények

3.1 KAT1 inaktiváció alacsony extracelluláris kálium koncentráció mellett

Hertel, B., Horváth, F., Wodala, B., Hurst, A., Moroni, A., Thiel, G. KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium (2005) *Journal of Experimental Botany*, 56 (422), Pages 3103-3110. Cited 5 times. IF.: 3.336.

ÖSSZEFOGLALÁS

Állati K-csatornákon végzett számos kísérlet szerint az extracelluláris K^+ eltávolítása az ioncsatorna kation-szelektív inaktiválódásához vezet. Atomi méretekben a KscA modell csatorna esetén ezt azzal magyarázták, hogy a Na^+ ionoktól eltérően a K^+ ionok stabilizálják a szelektivitási szűrő konformációját (Zhou és mtsai., 2001). Kutatásunk legfontosabb felfedezése korábbi tanulmányoktól eltérően az, hogy a növényi befelé egyenirányító KAT1 kálium csatorna sem jelent kivételt ez alól. Az extracelluláris kálium (K^+_o) mikromólos koncentráció-tartományában a csatorna feszültség-független módon inaktiválódik. A KAT1 csatorna pórusszerkezete a többi kálium csatornáéval megegyezik (Ramon és mtsai., 2003), ami azt jelenti, hogy e növényi ioncsatorna pórúsának stabilitása is a K^+ ionok csatornához kötődésének következménye. Eredményeink két, az állati csatornákhöz képest sokkal erősebb affinitással rendelkező kötőhely létezésére utalnak. Míg más csatornák a millimoláris K^+_o koncentráció mellett már inaktiválódnak (Eghbali és mtsai., 2002), addig KAT1 csak körülbelül 20 μM K^+_o esetén éri el a gátlás maximumának féltértékét. Ebben a tekintetben a KAT1 az állati Ca^{2+} -aktivált K^+ (BKCa) csatornához (MaxiK-csatorna) hasonlít, mely szintén μM koncentrációjú K^+_o esetén inaktiválódik (Vergara és mtsai., 1999).

Korábbi vizsgálatok a KAT1 kation-érzékeny kapuzási működését detektálták. A kapuzási séma szerint a csatorna feszültség- és kation-függő módon a gátolt állapotból felszabadulva nyitott állapotúvá válik. A deaktiváció kinetikája különböző lehet attól függően, hogy az aktív állapot mellett magas vagy alacsony $[K^+_o]$ volt jelen. Kutatásunk szerint azonban a deaktiváció kinetikáját nem befolyásolja $[K^+_o]$, tehát nyitvatartási valószínűség csökkenése mikromoláris $[K^+_o]$ esetén más molekuláris mechanizmus eredménye. A farki áram amplitúdók csökkenése anélkül, hogy azok kinetikája közben megváltozna arra utal, hogy a működő csatornák száma csökken, miközben a csatorna kapuzási tulajdonságai nem változnak. Az eredmények összhangban állnak a tipikus C-típusú inaktiváció kritériumaival (Eghbali és mtsai., 2002). Összefoglalásként, az eredményeink arra mutatnak, hogy a KAT1 szelektivitási szűrője, más feszültségfüggő kálium csatornához hasonlóan, kapuként működik, amely alacsony $[K^+_o]$ esetén bezáródik.

A KAT1 K^+_o -érzékeny gátlása élettanilag fontos lehet. A KAT1 legnagyobb mértékben zárósejtekben expresszálódik, ahol a sztómanyitódás során a kálium felvételéért felelős. A zárósejtek környezetében az apoplaszt kálium koncentrációja néhány mM (Muhling és Lauchli, 1999), de bizonyos esetekben 50 μM alatt is lehet (Blatt, 1985). Az erős kálium hiány és az alacsony apoplaszt $[K^+_o]$ lényeges problémát jelent a növényi sejteknek, hisz ekkor a K^+ -ra vonatkozó hajtóerő a kálium kiáramlásának kedvez. Ha a befelé irányító kálium csatorna ekkor nyitott állapotú lenne, a kálium a sejtből kiszivárogná.

3.2 Az abszcizinsav hatására szintetizálódó NO sztómazáródásban betöltött szerepének vizsgálata. A NO hatása KAT1 homotetramer ioncsatornára

A Ördög, B Wodala, F Horváth. Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure. *Acta Biol Szeged* 2008, 52(1):163-165. Konferencia összefoglaló.

ÖSSZEFOGLALÁS

A NO, az abszcizinsav jelátviteli út részeként, blokkolja a befelé egyenirányító K⁺-csatornákat. A gátlás két módon történhet: vagy közvetett úton a belső Ca²⁺ szint növelésén keresztül, vagy közvetlenül a csatorna alegységek aminosav oldalláncainak nitrozilációja révén. Ennek kiderítése érdekében KAT1 homotetramer csatornákat HEK293 heterológ expressziós rendszerben expresszáltattunk, majd whole-cell patch clamp méréseket végeztünk. Megállapítottuk, hogy a zárósejtekben legnagyobb mértékben expresszáladó homotetramer KAT1 csatorna még magas (100 μM) NO koncentráció esetén sem inaktiválódik. A csatornaáram sem az extracelluláris, sem az intracelluláris oldal felől sem bizonyult Ca²⁺-függőnek, tehát a közvetett, Ca²⁺-függő szabályozás a KAT1 homotetramer esetén nem érvényesül.

BEVEZETÉS

A nitrogén monoxid (NO) szabadgyök jelátvitelben betöltött szerepe a növényi sejtek esetében is bebizonyosodott. A gáz halmazállapotú NO olyan növekedésszabályzó anyag, mely elsősorban a védekező reakciók és az oxidatív stressz során keletkezik, de a sztómazáródásban és a mezofill sejtek fotoszintézisének szabályozásában is részt vesz. A kutatás célja a NO hatásának vizsgálata a sztómazáró sejtek membrántranszportja tekintetében.

A sztómányílások méretét, így a fotoszintézishez szükséges CO₂ beáramlását illetve a párologtatásból eredő vízvesztést a zárósejtek térfogata határozza meg. A zárósejtek duzzadása arányos a befelé irányuló kálium árammal, melyet Shaker-típusú kálium csatornák közvetítenek. Bebizonyosodott, hogy a NO az abszcizinsav jelátviteli út komponenseként emeli a citoszolikus szabad Ca²⁺ koncentrációt, ezáltal csökkenti a befelé irányuló kálium áramot és zárja a sztómákat.

A Shaker-csatornák négy monomer alegységből álló tetramer szerkezetű fehérjék. Az Arabidopsisban azonosított kilenc Shaker-csatorna génből öt, nevezetesen a *KAT1*, a *KAT2*, az *AKT1*, az *AKT2/3* és az *AtKCI* zárósejtekben is expresszáladó monomereket kódol. A különböző monomerekből történő összeszerelődés meghatározza a csatorna tulajdonságait: például az AKT2/3 monomer tehető felelőssé a külső Ca²⁺-függésért, mivel az *akt2/3* knockout mutánsban hiányzik a feszültség- illetve a Ca²⁺-függő sztómazáródás (Ivashikina és mtsai., 2005). Mind a homotetramer, mind a heterotetramer formák heterológ expressziós rendszerekben funkcionálisnak bizonyultak. Ez alól kivételt az *AtKCI* monomer jelent, amely csak KAT1 vagy AKT1 monomerrel tud funkcionális csatornát létrehozni (Duby és mtsai., 2008).

A KAT1 hiperpolarizáció aktivált, befelé egyenirányító K⁺ csatorna monomer, kiemelten fontos a zárósejtek térfogatának a szabályozásában. Kiderült azonban az is, hogy a *kat1* mutáns növényekben normálisnak tűnő kálium áramok és sztómányitódás figyelhető meg. Ennek oka az lehet, hogy a KAT1 hiányában más befelé egyenirányító csatorna monomerek túlexpresszáladtak, és pótolták a KAT1 áramát (Szyroki és mtsai., 2001). A KAT1 feszültségfüggését több intracelluláris faktor is befolyásolja, ilyen például a citoszolikus pH, az ATP és a cGMP (Hoshi, 1995).

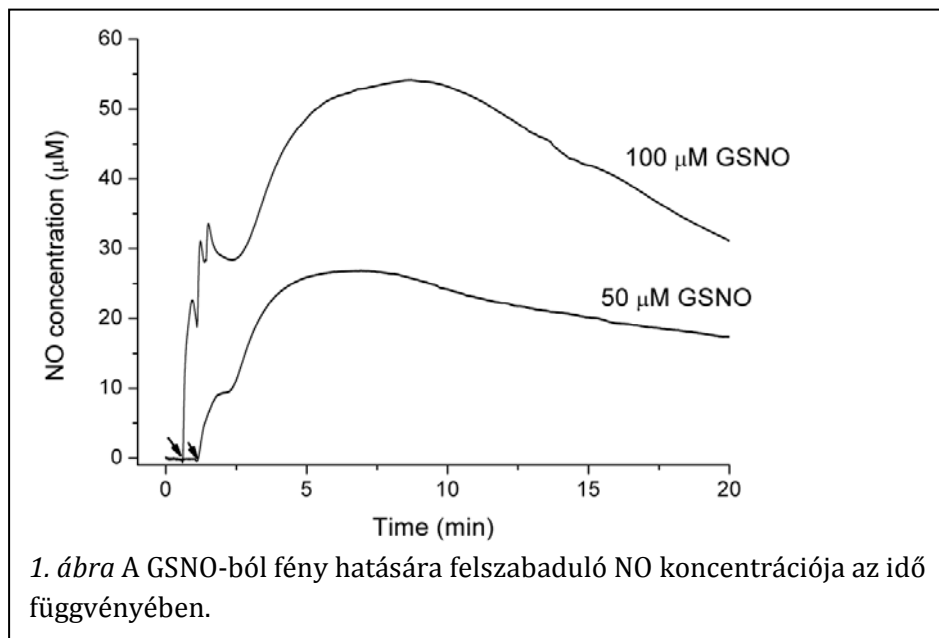
Kutatási céljaim egyike, hogy kiderítsem a NO lehetséges gátló hatását homo- és heterotetramer Shaker-csatornák esetén. A kísérletekhez használt ioncsatorna géneket

Arabidopsis thaliana cDNS könyvtárból azonosítottuk, majd megfelelő primereket tervezve, PCR segítségével amplifikáltuk. Az így nyert géneket pEGFP-N2 vektorba klónoztuk, mellyel humán embrionális vesesejteket (HEK293) transzfektáltunk. Jelen munkámban a KAT1 hiperpolarizáció aktivált homotetramer csatornával foglalkozom.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Nitrogén monoxid kalibrálás

A NO hatásvizsgálata során NO donorként S-nitrozoglutationt (GSNO) használtam 10, 50 és 100 μM -os koncentrációban. A GSNO fény hatására NO-ra és oxidált glutationra (GSSG) bomlik. A GSNO oldatot 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű fehér fényvel (Schott KL2500, Németország) világítottam meg, majd a felszabaduló NO mennyiségét NO elektróddal mértem (ISO-NOP, WPI Inc, USA) (1. ábra). A NO elektród kalibrálását a gyártó utasítása szerint pH 4,0 kémhatású CuSO_4 oldathoz adagolt S-nitrozo-N-acetilpenicillamin (SNAP) segítségével végeztem el.



A HEK293 sejt kultúra tenyésztése és transzfekciója

A KAT1 ioncsatorna heterológ expressziójához human embrió vesesejteket (HEK293) használtunk fel. A HEK293-as sejtek előnye a könnyű fenntarthatóság és transzfekció, valamint a patch clamp méréseknél fontos magas seal kialakítási sikeresség. A HEK293 sejteket az alacsony endogén csatornaaktivitás jellemzi, mely fontos szempont, hiszen a KAT1 HEK293 sejtben történő patch clamp vizsgálatok az esetleges endogén háttéráramok nem volnának elkülöníthetők a KAT1 áramoktól, így a mérések pontatlanná válnának.

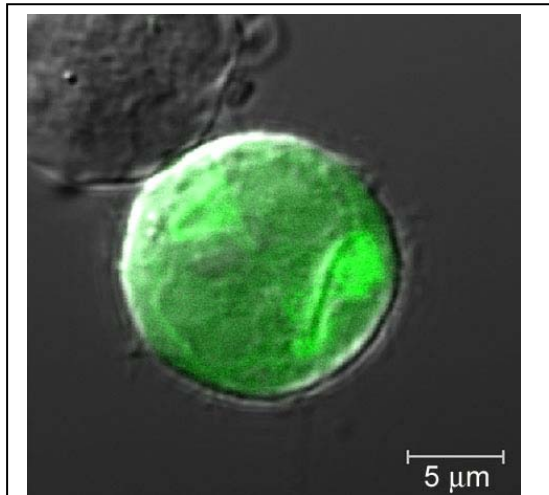
A sejteket inkubátorban 37°C-on, 5% CO_2 mellett, tápoldatban neveltük. A tápoldat kilenc rész DMEM/F12 szérumban és egy rész borjúsérumot, valamint a fertőzések elkerülése érdekében antibiotikumot is tartalmazott (penicillin és sztreptomycin, 10 U/ml). A sejt kultúrát 3-4 naponként új tenyésztőedénybe oltottuk át. A passzázs során először a tápoldatot leszívtuk a sejtekről, majd PBS pufferrel (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4 KOH) átmostuk őket, hogy az elpusztult, az edény falához nem tapadó sejteket eltávolítsuk. A sejteket egymástól és a tenyésztő edény aljától

1%-os Trypsin-EDTA oldat segítségével választottuk el. A kapott sejtszuszpenzióból egy millilitert friss tápoldatot tartalmazó tenyésztőedényekbe tettünk át. Ekkor van lehetőség arra is, hogy egy kis mennyiségű sejtoldatot a patch clamp mérésekhez Petri-csészékbe, illetve a transzfekcióhoz is elkülönítsünk.

A transzfekció során a *pEGFP-N2-KAT1* (BD Biosciences, Clontech, USA) vektort jutattam HEK293 sejtekbe, kationos lipid precipitációs technika segítségével, melyhez Metafectene[™] Pro reagenst (Biontex, Németország) használtam. A módszer szerint először a pozitív töltésű, 30 µm átmérőjű liposzómákat tartalmazó reagenst elegyítettem a bejuttatni kívánt DNS-sel. A sejteken a tápoldatot szérumentesre cseréltem, és az elkészített DNS-lipid komplexet (lipoplex) óvatosan a sejtekre csöpögtettem.

Az állati sejtek endocitózissal képesek a lipoplexek felvételére, bekebelezésére. Az így keletkezett endoszómába protonok pumpálódnak, így csökken a pH, majd a membrán felhasad. A plazmidok a citoplazmába kerülnek, azonban mivel túl nagyok ahhoz, hogy a sejtmaghártya pórusain át tudjanak jutni, az első sejtosztódásig várniuk kell. A mitózis során bejutnak a sejtmagba, ahol folyamatos KAT1 expressziót fognak biztosítani. A plazmidról a KAT1 gén mellett a GFP gén is átíródik, így gerjesztő fény alkalmazásával könnyen azonosíthatóak a sikeresen transzfektált sejtek (2. ábra).

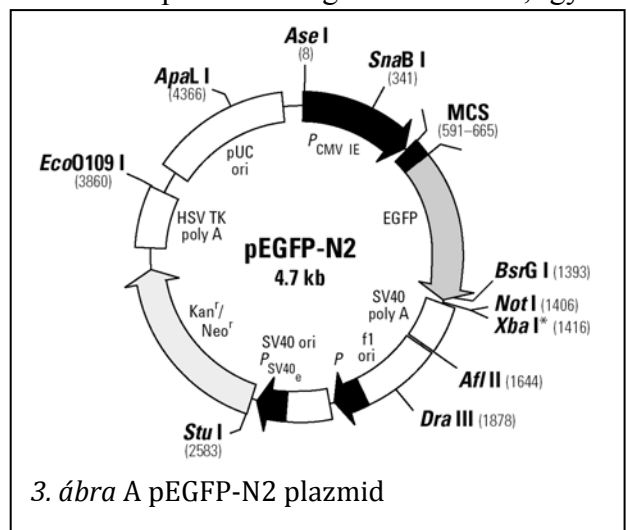
A transzfektált sejteket a transzfekciót követő 24 órában lehet patch clamp mérésekre felhasználni.



2. ábra A sikeresen transzfektált sejtek 470 nm-es gerjesztőfény hatására zölden fluoreszkálnak

A pEGFP-N2 vektor

A *KAT1* gén heterológ expressziójához vektorként a pEGFP-N2 plazmidot (Clontech, USA) használtuk (3. ábra). A 4,7 kb méretű plazmid két replikációs origót is tartalmaz, így a plazmid eukariótákban (SV40 ori), illetve prokariótákban (pUC ori) is replikálódhat, a kanamicin/neomicin rezisztencia gén (Kan^r/Neo^r) pedig sikeresen transzfektált prokarióta, vagy eukarióta sejtek plazmidra történő szelekcióját teszi lehetővé. A plazmid klónozó helyétől 5' irányban található citomegalovírus korai promotere ($P_{CMV IE}$) igen erős expressziót biztosít eukarióta sejtekben, az EGFP szekvenciától 3' irányban lévő SV40 poliadenilációs szignál (SV40 polyA) pedig az EGFP mRNS megfelelő érését szabályozza. A plazmidba klónozott *KAT1* szekvencia az EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) szekvenciával egy leolvasási keretbe került és nem tartalmaz stop kodont, ezért az expresszió eredménye egy fúziós fehérje. A mérések során fluoreszcens mikroszkópot (Eclipse TS100, Nikon, Japán) használtunk, így az EGFP fluoreszcenciája alapján lehetőségünk nyílt a transzfektált sejtek és a kontroll sejtek elkülönítésére. Noha a *KAT1* az EGFP-vel kovalensen kapcsolódott, számos mérés támasztja alá, hogy az EGFP nem zavarja a *KAT1* áramot.



3. ábra A pEGFP-N2 plazmid

A génkonstrukciók előállítása

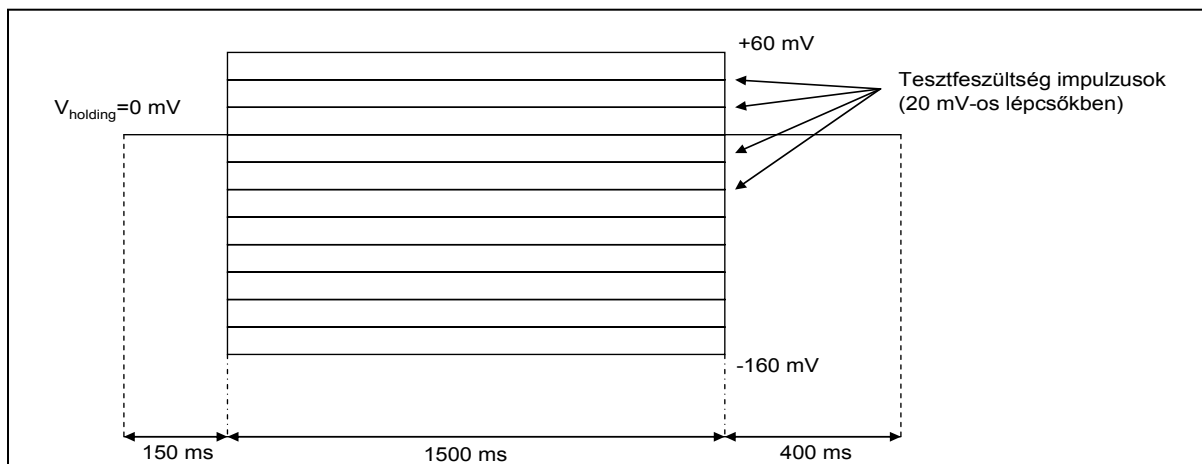
A kilenc azonosított Shaker-típusú, befelé egyenirányító ioncsatornát kódoló génből zárósejtben öt expresszálódik. Zárósejtben való egyenkénti vizsgálatuk szinte lehetetlen, mivel a csatornák ionáramai egymást elfedik, kiegészítik. Ezért célszerű az egyes ioncsatornák tulajdonságait heterológ expressziós rendszerben felderíteni.

Az *Arabidopsis thaliana* ioncsatorna gének teljes hosszúságú cDNS szekvenciáját a The Arabidopsis Information Resource (www.tair.org) adatbázisából kikerestük. Az UTR szekvenciákat figyelmen kívül hagyva a PCR reakcióhoz primereket terveztünk, a restrikciós enzimek hasítóhelyeivel. A PCR reakcióban templátként olyan cDNS könyvtárat alkalmaztunk, melyben az általunk kiszemelt összes ioncsatorna génje megtalálható volt. Az amplifikált DNS darabokat pBluescript plazmidba klónoztuk szekvenálás céljából. Heterológ expressziós vizsgálatokhoz a hibátlan cDNS-eket megfelelő restrikciós enzimeket használva pEGFP-N2 emlős expressziós vektorba helyeztük. Terveink között szerepel olyan konstrukciók létrehozása is, ahol a plazmidokban kettő, esetleg három ioncsatorna gén szerepelne, így heterotetramer formában is tesztelhetnénk őket.

A patch clamp mérés technika

A KAT1 elektrofiziológiai vizsgálatához a patch clamp technikát alkalmaztuk, mely a membránpotenciál rögzítése mellett lehetővé teszi a membránon átfolyó áramok regisztrációját. A patch clamp technika mérési elrendezései közül a whole-cell üzemmódot használtuk, azaz a seal kialakítását követően egy erősebb szippantással a membránfoltot beszakítottuk, így a sejtmembrán egész felületén folyó áramokat vizsgálni tudtuk.

A whole-cell mérésekhez a 4. ábrán bemutatott feszültség protokollt alkalmaztam minden egyes sejt esetén. A 12 lépcsős feszültség protokoll szerint a sejtek membránpotenciálját -160 mV-tól $+60$ mV-ig terjedő tartományban, 20 mV-os lépcsőkben, 1500 ms ideig rögzítettem. A tartófeszültséget 0 mV-nak választottam. A kísérleteket EPC-10 patch clamp erősítővel (HEKA, Németország) végeztem, az adatokat PatchMaster szoftverrel (HEKA, Németország) értékeltem.

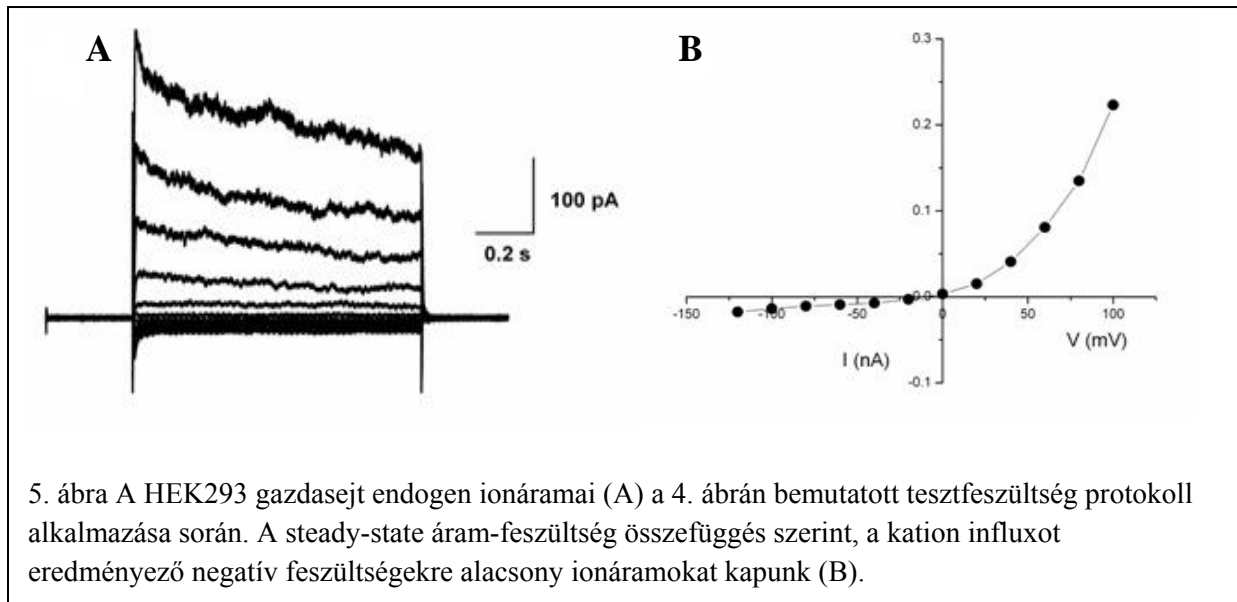


4. ábra A whole-cell patch clamp mérések során alkalmazott feszültség protokoll.

A whole-cell patch clamp eredmények értékelése

Az elektrofiziológiai mérések során a HEK293 sejtekre bocsátott tesztfeszültség lépcsőkre a sejt ionáramát regisztráltam (5/A ábra). Az tesztfeszültség-impulzus utolsó, 100 ms-os szakaszának áramértékeit a tesztfeszültség függvényében ábrázolva megkaptam a sejtre jellemző stady-state feszültség-áramerősség karakterisztikát (5/B ábra). Ezen a ponton

érdemes megjegyezni, hogy az egyes sejtekben regisztrált áramok nagysága több tényezőtől is függ. Kísérletünkben ezek közül meghatározó a transzfekció során az illető sejtbe került plazmidok száma, illetve az ezekről történő expresszió erőssége. Ebből arra lehet következtetni, hogy a különböző sejtekben mért áramokat az abszolút értékeik szerint nem, csak változásuk arányában szabad összehasonlítani.



A méréshez használt oldatok

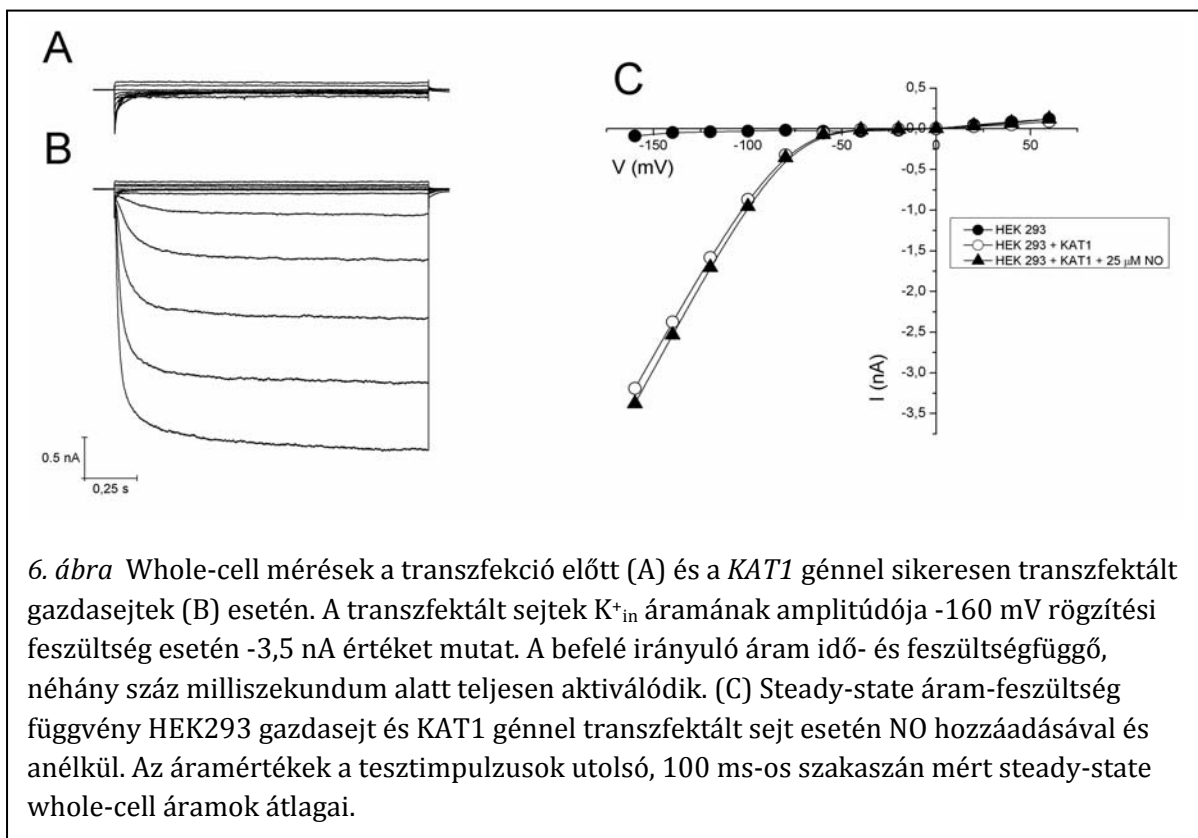
A patch clamp mérések esetében az alap sejtürdő oldat összetétele: 130 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES és 10 mM kolin-Cl, pH-ja pedig 7,4. A külső Ca^{2+} -függés vizsgálatakor a sejtürdő oldat Ca^{2+} koncentrációját 20 mM-ra növeltem, ezzel együtt a KCl koncentrációját 110 mM-ra csökkentettem az ozmolaritás megőrzése miatt. A mérések közben a sejtürdő oldatot perfúziós rendszer segítségével cseréltem le a sejtek felett.

Az alap pipettatóltó oldat összetétele: 130 mM kálium-glutamát, 10 mM NaCl, 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 0,1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM Na-ATP, 0,1 mM GTP és 5 mM foszfokreatin, a pH-ja 7,4-re lett beállítva. A pipettatóltó oldatban a belső Ca^{2+} -függés vizsgálatakor a Ca^{2+} koncentrációját úgy emeltem, hogy a belső szabad Ca^{2+} ionok koncentrációja 220 nM illetve 1,5 μM legyen. A belső szabad Ca^{2+} koncentrációt EGTA kalkulátor (<http://brneurosci.org/egta.html>) segítségével számítottam ki.

EREDMÉNYEK

A KAT1 ioncsatorna NO-függésének felderítésére a transzfektált HEK293 sejteken whole-cell patch clamp méréseket végeztünk. A HEK293 gazdasejtek alacsony befelé irányuló endogén csatornaaktivitással rendelkeznek (6/A ábra), ezért a befelé egyenirányító ioncsatorna gének heterológ expresszió alapuló vizsgálataira tökéletesen alkalmasak.

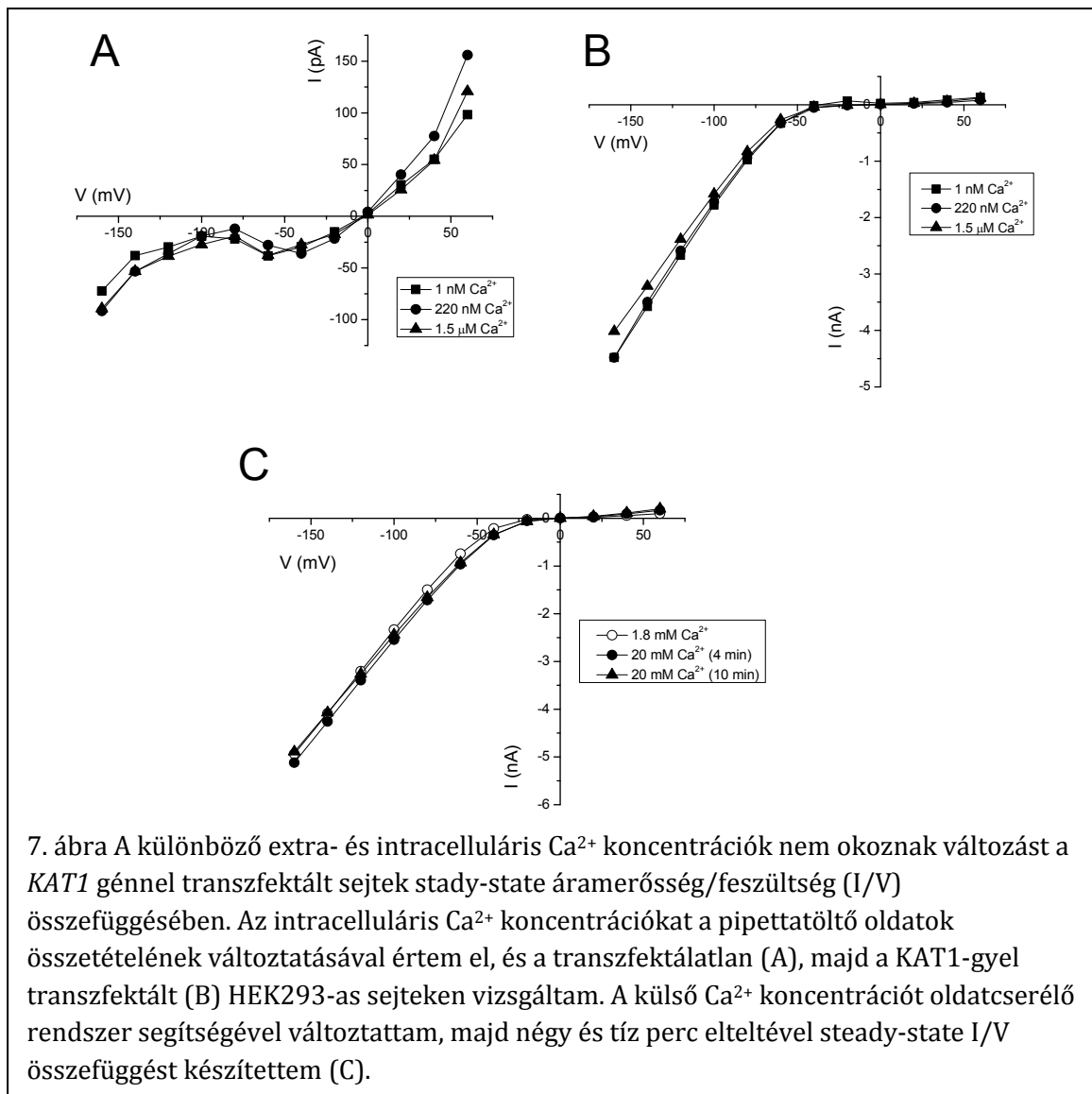
A sikeresen transzfektált sejtek KAT1 homotetramer csatornáinak ionáramai méretben és kinetikában is különböznek a gazdasejtétől (6/A és 6/B ábra). A befelé irányuló áramok a KAT1 tipikus steady-state I/V karakterisztikáját és kinetikai jellemzőit mutatják (6/C ábra).



A cisztein aminosavak tiol-csoportjának S-nitrozilációja, azaz a NO reverzibilis kötődése a fehérjékhez, része egy ősi, jól definiált jelátviteli folyamatnak. Abból a célból, hogy a NO lehetséges S-nitrozilációs hatását a KAT1 ioncsatorna fehérjén megvizsgáljam, a sejtürdő oldatba fotolabilis NO donor molekulát (GSNO) jutattam. A 25 és 50 μM koncentrációjú GSNO oldatban $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fehér fény hatására a patch clamp mérések idején körülbelül 10-20 μM koncentrációjú NO keletkezett. A zárósejtekkel foglalkozó korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a csatornákat alkotó fehérjék, vagy regulátor proteinek S-nitrozilációján keresztül már 10-20 nM NO is teljesen gátolja a befelé irányuló kálium áramot. Mivel a NO a csatornára jellemző relaxációs kinetikát és feszültségfüggést nem befolyásolta, arra következtettek, hogy a csatornák inaktiválásával éri el hatását (Sokolovski és Blatt, 2004). Méréseim során úgy találtam, hogy a NO még mikromólos koncentráció esetén sem módosítja a KAT1 áramok nagyságát és kinetikáját (6/C ábra). Arra következtettem, hogy a NO az S-nitroziláción keresztül nem befolyásolja az aktív KAT1 homotetramer csatornák számát.

A zárósejtben NO hatására az intracelluláris raktárakból Ca^{2+} szabadul fel, így megnő a citoplazma szabad Ca^{2+} koncentrációja (Garcia-Mata és mtsai., 2003). A magasabb Ca^{2+} koncentráció miatt a Ca^{2+} -érzékeny, befelé irányuló kálium áramok inaktiválódnak. Arra voltam kíváncsi, hogy a KAT1 homotetramer részét képezheti-e a NO közvetített Ca^{2+} -függő jelátviteli útnak, ezért a patch clamp mérések során változtattam a sejtürdő-, illetve a pipetta töltő oldat szabad Ca^{2+} koncentrációját. A sejtürdő oldat a sejt extracelluláris, a pipettatöltő oldat pedig az intracelluláris tereként funkcionál. A kísérletek során a szabad Ca^{2+} mennyiségét a zárósejt fiziológiás állapotának megfelelően 1 nM-nak, 220 nM-nak és 1,5 μM -nak választottam (7. ábra).

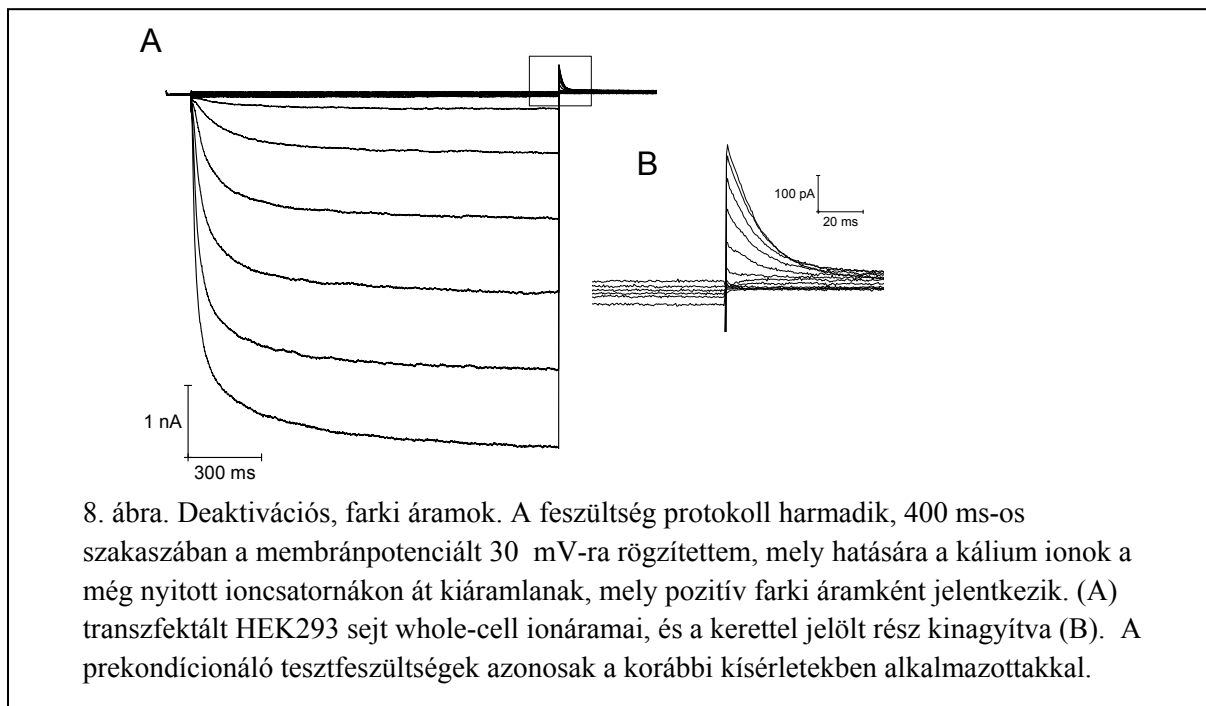
Eredményül azt kaptam, hogy még a 1,5 μM -nyi, azaz a nyugalmi Ca^{2+} -szint 10-15-szöröse sem okozott változást az áramok nagyságában és kinetikájában. Megállapítottam, hogy a KAT1 homotetramer csatorna aktivitása nem függ sem az extra- (7/C ábra), sem az intracelluláris (7/B ábra) Ca^{2+} szint változásától.



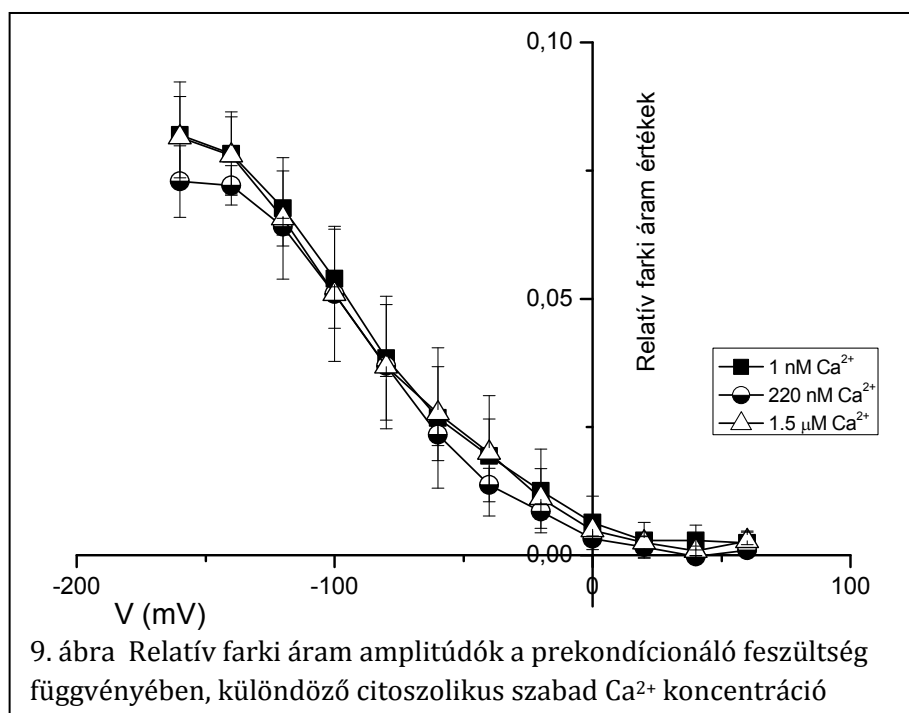
7. ábra A különböző extra- és intracelluláris Ca²⁺ koncentrációk nem okoznak változást a KAT1 génnel transzfektált sejtek steady-state áramerősség/feszültség (I/V) összefüggésében. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációkat a pipettatöltő oldatok összetételének változtatásával értem el, és a transzfektálatlan (A), majd a KAT1-gyel transzfektált (B) HEK293-as sejteken vizsgáltam. A külső Ca²⁺ koncentrációt oldatcserélő rendszer segítségével változtattam, majd négy és tíz perc elteltével steady-state I/V összefüggést készítettem (C).

A sikeresen transzfektált sejtek különböző mértékben expresszálják a KAT1 csatornafehérjét. Egy adott rögzítési feszültségen ezért sejtenként más és más steady-state áramot mérhetünk, akár nagyságrendbeli különbségek is előfordulnak. A teljes sejtmembrán áramot (I) az aktív csatornák számának (N), az egy csatorna áramának (i) és a nyitvatartási valószínűségnek (P_O) a szorzata adja: $I = NiP_O$, ahol P_O az adott időpillanatban nyitott csatornák részarányát mutatja.

Mivel a pipetta töltőoldat összetétele a mérés során nem változtatható, a citoszolikus Ca²⁺-függés kiméréséhez az eltérő erősségű expresszióval rendelkező sejtek kontrollként nem alkalmazhatók. Megoldásként, a deaktivációs, farki áramok analízise során az áram amplitúdókat a -160 mV tesztfeszültségen mért steady-state áramértékkel visszaosztottuk. A farki áramok megjelenésének hátterében az áll, hogy a prekondicionáló tesztfeszültségek végére az ioncsatornák elérik a feszültségre jellemző átlagos nyitottsági szintjüket. Ekkor hirtelen azonos, a kálium egyensúlyi potenciáljához képest pozitívabb, +30 mV értékre változtatjuk a tartófeszültséget, mely a nyitott csatornákon keresztül ellenkező irányban mozgatja az ionokat. Az ioncsatorna deaktiválódik, és a deaktivációs áram amplitúdók alapján következtethetünk a steady-state szakaszra jellemző nyitvatartási valószínűsége (8. ábra).



A farki áram amplitúdókat a -160 mV-on mért steady-state áram értékekre vonatkoztatva, több sejt átlagaként ábrázolva kiderült, hogy a relatív farki áramok nem változnak az eltérő citoszolikus Ca^{2+} koncentráció függvényében (9. ábra). A csatorna konduktanciát a $G = I_{\text{tail}} / (V - E_K)$ összefüggéssel kaphatjuk, ahol az I_{tail} a deaktivációs áram amplitúdókat, V a prekondicionáló feszültséget és E_K a kálium egyensúlyi potenciálját jelöli. G feszültségfüggését a citoszolikus Ca^{2+} nem befolyásolta.



Bebizonyosodott, hogy a KAT1 homotetramer csatornát a NO nitroziláción keresztül közvetlenül nem inaktíválja. Kiderült, hogy a csatornaáram sem az extracelluláris sem az intracelluláris oldal felől nem Ca^{2+} -függő, tehát a közvetett, Ca^{2+} -függő szabályozás a KAT1 homotetramer esetén nem érvényesülhet.

3.3 A NO in vivo támadáspontjai a fotoszintetikus elektrontranszportláncban - Klorofill fluoreszcencia indukciós mérések borsó leveleken

Wodala, B., Deák, Zs., Vass, I., Erdei, L., Altorjay, I., **Horváth, F.** *In vivo* target sites of NO in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves (2008) *Plant Physiology*, 146 (4), Pages 1920-1927 Cited 0 times. IF.: 6.367.

ÖSSZEFOGLALÁS

A növények az állatokhoz hasonlóan reagálnak a környezet NO szintjének változására, és maguk is képesek NO szintézisre enzimatis és nem enzimatis úton egyaránt. A NO kis molekulású, rövid féléletideje és egyéb kémiai tulajdonságainak köszönhetően ideális jelátvivő molekula. Biológiai rendszerekben reagálhat oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolszerekkel és átmeneti fémekkel; tehát a tiol-csoporttal, illetve átmeneti fémmel rendelkező fehérjék a NO jelátvitel fontos célmolekulái. A fotoszintetikus és mitokondriális elektrontranszport-lánc egyes komplexei között bőven akad átmenetifém-tartalmú molekula. A megemelkedett exogén NO szint fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását azonban intakt levél esetén kevesen vizsgálták. Korábbi mérések ugyan bizonyították, hogy a NO csökkenti a zab és lucerna levelek nettó fotoszintézisét (Hill és Bennett, 1970), de a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésére gyakorolt hatásának finomabb feltárásával kevés tanulmány foglalkozott, és ezek eredményei egymásnak több ponton ellentmondanak.

A NO szignalizáció sejten belüli célpontjai között a mitokondrium, a peroxiszóma és a sejttag mellett a kloroplasztiszok is szerepelnek, ahol a NO fotoszintézis gátlást okoz a fehérjeszintézis megváltoztatása révén (Lum és mtsai., 2005). A NO emellett közvetlenül a fotoszintetikus elektrontranszport-láncon keresztül is szabályozható. Az egyik legfontosabb ilyen szabályozó hely a tilakoid membránba ágyazott nagyméretű pigment-protein komplex, a második fotokémiai rendszer (PS II). NO gázzal végzett EPR és klorofill a fluoreszcencia kísérletek izolált tilakoid membránok esetében egyértelműen kimutatták, hogy a NO a PS II több pontjához reverzibilis módon kötődhet, az itt kötött bikarbonát koncentráció-függő módon kiszorítja, ezzel gátolja az elektrontranszportot. Ilyen például a Q_A és Q_B kötőhely között található nem-hem (II) vas (Diner és Petrouleas, 1990) és a vízbontó komplex mellett Y_D tirozin gyök (Sanakis és mtsai., 1997; Schansker és mtsai., 2002) és a vízbontó komplex Mn-csoportja (Schansker és mtsai., 2002).

Takahashi és Yamasaki (2002) tilakoid membránokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy a NO-donor S-nitroso-N-acetilpenicillamin (SNAP) az optimális kvantumhasznosítást (F_v/F_m) nem befolyásolja, viszont gátolja a lineáris elektrontranszport sebességét, a transztilakoid pH különbséget, és csökkenti az ATP szintézis mértékét. A bikarbonát mennyiségét jelentősen megemelve viszont úgy találták, hogy a NO fotofoszforylációt gátló hatása megszüntethető. Yang és mtsai. (2004) kísérleteikben azt látták, hogy intakt burgonya levelekben a nátrium-nitroprusszid- (SNP) kezelés hatására a nem-fotokémiai kioltás (NPQ) nem változik, viszont az SNP koncentráció-függő módon csökkenti az optimális kvantumhasznosítást.

Munkánk célja, hogy különböző NO donor (SNP, GSNO, SNAP) és NO akceptor molekulák (hemoglobin, illetve PTIO) alkalmazásával tisztázzuk a NO fotoszintetikus elektrontranszport-láncre gyakorolt hatását *in vivo*, intakt borsó (*Pisum sativum*) levelekben. Mivel az SNP-kezelés hatása részben a donormolekulából felszabaduló cianidnak köszönhető, illetve kísérleti elrendezésünkben a SNAP NO produkciója igen szerénynek bizonyult, a vizsgálatainkat a GSNO nevű specifikus NO donormolekula alkalmazásával folytattuk, mivel a GSNO esetében csak a felszabaduló NO okozott változást. A Q_A^- reoxidációs mérések

alapján megállapítható, hogy a NO az intakt levelekben PS II donor és akceptor oldali gátlást okoz, mivel akadályozza a töltésrekombinációt Q_A^- és az S_2 állapotú vízbontó komplex között, illetve a PSII Y_D tirozinjával is interferál. Klorofill fluoreszcencia indukciós mérések tanúsága szerint csökkenti a steady-state fotokémiai és nem fotokémiai kioltást, illetve a levelek optimális kvantumhasznosítását is. A GSNO-kezelés koncentráció-függő módon csökkenti a nem-fotokémiai kioltást (NPQ), illetve módosította a tranziens NPQ hosszát is, vélhetően a Calvin-ciklus aktivációjának késleltetése útján.

A NO tehát gátolja a lineáris elektrontranszportot, és fotoinhibíciót okoz intakt levelekben.

Vizsgálatunk eredményei összességében megerősítik a korábbi *in vitro* eredményeket és további ígéretes kutatási lehetőséget ígérnek a NO fotoszintetikus elektrontranszportban betöltött potenciális reguláló szerepére vonatkozóan.

3.4 A NO gátolja a zárósejtek fotoszintézisét

A kutatási témából folyóirat cikk készül, amit az elkövetkezendő egy éven belül szeretnénk publikálni

ÖSSZEFOGLALÁS

A zárósejtek fotoszintézise sok tekintetben különbözik a mezofill sejtektől, a legfontosabb azonban az, hogy az első fotokémiai rendszer (PS I) környezetében a NADPH-ferredoxin reduktáz mellett a molekuláris oxigén is fontos elektron akceptorként működik. A zárósejtek fluoreszcencia indukciós kinetikája mikroszkópos PAM módszerrel a mezofill sejtektől függetlenül vizsgálható. A NO fotoszintézisre gyakorolt hatása mezofill sejtek esetén a második fotokémiai rendszerhez (PS II) köthető. A zárósejt protoplaszt extracelluláris oldatösszetételét változtatva megállapítottam, hogy a NO a mezofill sejtekhez hasonlóan csökkenti az optimális- és effektív kvantumhasznosítást, valamint a fotokémiai kioltást. Arra következtettem, hogy a NO fotoszintézist gátló hatása miatt kevesebb ozmotikusan aktív cukor és kevesebb ATP képződhet, mely a plazmamembrán alacsonyabb mértékű hiperpolarizációját eredményezi, így a gázcsere nyitódását akadályozza.

BEVEZETÉS

A magasabbrendű növényekben a gázcsere nyitódásának köszönhetően a fotoszintézishez szükséges CO_2 beáramlása, illetve a párologtatásból eredő vízvesztés szorosan együtt szabályozódik, és folyamatosan alkalmazkodik a külső környezeti tényezőkhez. Ahhoz, hogy mindez zökkenőmentesen és gyorsan mehessen végbe, a zárósejtekben bonyolult jelátviteli- és anyagcsere útvonalak léteznek.

A növények zöld szöveteiben a kloroplasztiszok és a mitokondriumok ATP-vel és redukáló erővel (NADPH, NADH) látják el a sejteket. A zárósejtek tekintetében úgy gondolják, hogy a magas sejtlégzési szint mellett alacsony fotoszintetizáló képesség bújlik meg. A zárósejtekben számos mitokondrium található. A mitokondrium-bőség és a magas légzési szint arra utal, hogy az ATP fő forrása az oxidatív foszforiláció lehet. A zárósejtekben található mitokondriumok az oxidatív elektrontranszport során mind a citokróm rendszert, mind az alternatív utakat használják.

A mitokondriumokkal ellentétben, a kloroplasztiszokból viszonylag kevés (a mezofill sejtekben található mennyiség kb. harmada) található bennük. A zárósejtek kloroplasztiszai ezen kívül a mezofill sejtekénél kisebbek, kevesebb tilakoiddal és gránummal rendelkeznek. A kloroplasztiszokban található klorofill mennyisége körülbelül 1-4%-a, a nem ciklikus- és a ciklikus fotofoszforiláció értéke nagyjából 80%-a a mezofill sejtekének, sőt a zárósejtekben a PS I környezetében a NADPH-ferredoxin reduktáz mellett a molekuláris oxigén is fontos elektron akceptorként működik. Fényben, a keletkezett redukáló erő képes a Calvin-ciklus

meghajtására. Biokémiai módszerekkel bizonyították a Calvin-ciklushoz szükséges enzimek jelenlétét, bár kimutatták azt is, hogy nagyon alacsony a Rubisco enzim mennyisége. Egy másik fontos eltérés, hogy a zárósejtek sötétben nem metabolizálják a keményítőt, fényben viszont a keményítő lebontódik, és a keletkező malát anionok a beáramló kálium ionok ellenionjaiként halmozódnak fel. Kísérleteim során *Arabidopsis thaliana* zárósejt protoplasztokon fluoreszcencia indukciós méréseket végeztem, hogy a NO fotoszintézisre gyakorolt hatását a mezofill sejtekével összehasonlítsam.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növénynevelés

Lúdfű növényeket (*Arabidopsis thaliana* var. Columbia; 11. ábra) üvegházban, kontrollált fényviszonyok (12 h fény + 12 h sötét) és kontrollált hőmérséklet (24°C) mellett neveltem, heti két alkalommal öntöztem, és hetente egyszer tápoldatoztam (Volldünger). A kísérletekhez 6-8 hetes növények törzssás leveleit használtam fel.

Protoplaszt készítés és izolálás

A zárósejt protoplasztokat egylépcsős emésztéssel nyertük. A 6-8 hetes *Arabidopsis thaliana* növények törzssás leveleinek abaxiális felszínéről epidermisz nyúzatokat készítettem, majd ezeket 2-3 percre az alapoldatba raktam (0,5 mM aszkorbinsav, 10 μ M KH_2PO_4 , 5 mM MES, 0,5 mM MgCl_2 , ozmolaritása 550 mOsm szorbitollal, pH 5,5 Tris-sel), a nyúzatokhoz tapadt mezofill sejtek eltávolítására. Ezután a nyúzatokat emésztő oldatba tettem (2% celluláz, 0,2% macerozim, 0,25% BSA, 1 mM CaCl_2 , ozmolaritása 520 mOsm szorbitollal, pH 5,6 KOH-val). Az emésztés 1 órán át, 22°C-on, 60 rpm sebességű rázás mellett, sötétben történt. Az emésztő oldat eltávolítása után friss alapoldatot adtam a nyúzatokhoz, és egy jól záródó üvegben 3 perces kopogtatással a sejteket kiszabadítottam, majd egy 20 μ m-es pórusú nylon hálón átszűrtem. A szűrletet 4°C-on, 800 rpm mellett 5 percig centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után, a leülepedett protoplasztokhoz újból friss alapoldatot adtam, majd a felhasználásukig jégen tároltam őket.

Microscopy-PAM

A Microscopy-PAM módszer alapja az impulzus amplitúdó modulált eljárás, mely akár egyetlen sejt indukált fluoreszcenciájának rögzítésére is alkalmas. Az elrendezésben a Microscopy-PAM rendszer egy inverz fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakozik (Axiovert 40 CFL, Zeiss GmbH, Németország). Esszenciális elemei a kék fényemittáló dióda (LED, NSBG 500, Nichia, Japán), mint az impulzus-modulált mérőfény forrása, a miniatűr fotoelektron-sokszorozó (PC/PM-MC, Walz GmbH, Németország), és az órajelet szolgáltató PAM-Control egység (Walz GmbH, Németország).

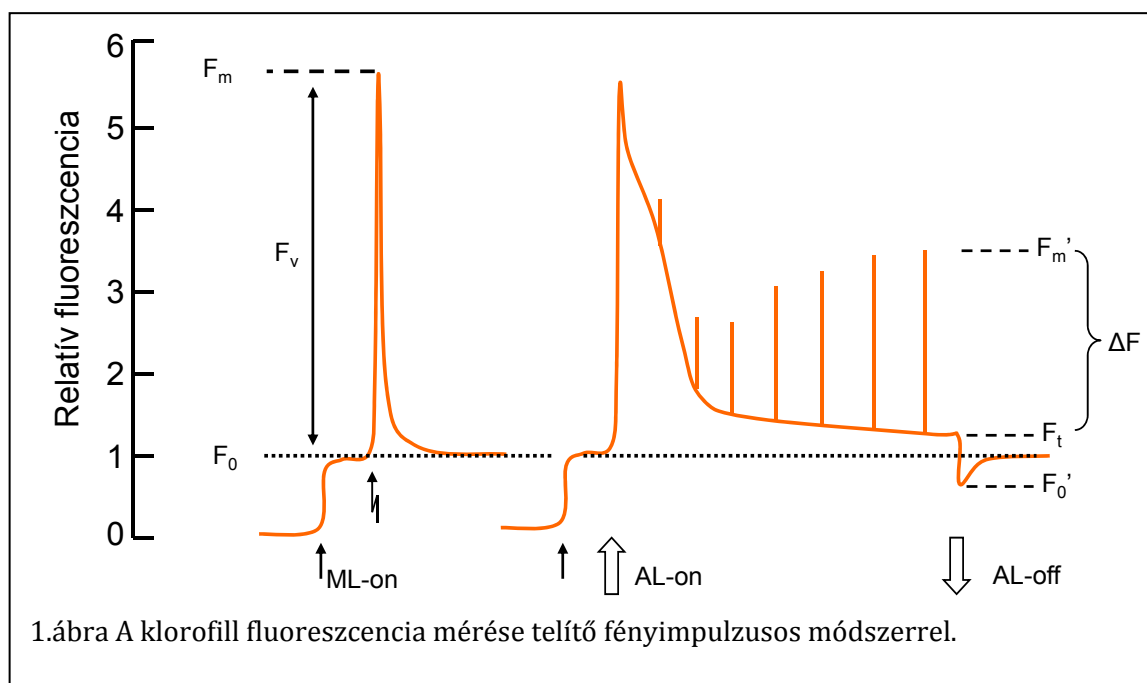
Fluoreszcencia indukció és quenching analízis

A második fotokémiai rendszerben az abszorbeált fotonok energiája háromféle úton hasznosulhat: 1. töltésszétválasztás során (fotokémiai kioltás), 2. hő formájában disszipálódhat, 3. vörös fluoreszcencia formájában reemittálódhat. E három folyamat egymással kompetícióban van, bármelyik hatékonyságának növekedése a többi csökkenését vonja maga után. A klorofill fluoreszcencia tehát információt nyújt a fotokémiai hatékonyságról és a hődisszipációról, ezért a mérésén alapuló módszereket előszeretettel alkalmazzák a növényi stresszfiziológia számos területén.

A klorofill fluoreszcencia quenching (kioltás) analízise során, az állandó aktinikus fényre telítő fényimpulzusokat építenek. Egy jellegzetes mérést mutat be az 1. ábra, ahol a mintát a mérést megelőzően legalább 15 percen keresztül sötétbe helyezték. Egy telítő fényimpulzus hatására (kb. 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,6-1 másodpercig) a fluoreszcencia az

alapállapotból (F_0) a maximális F_m értékre emelkedik. Az F_0 fluoreszcenciát gyenge mérőfényvel a sötétbe helyezett mintán állapítjuk meg. A méréssel a PS II maximális fotokémiai kvantumhatásfoka számítható, amelyet az F_v/F_m arány mutat.

Az ezt követő állandó megvilágítás során a fluoreszcencia tranziens emelkedése tapasztalható, mivel a szén fixálása csak később indul meg. Míg az elektrontranszport a megvilágítás után milliszekundumokon belül elkezdődik, a szénfixációs folyamatnak először fényaktiválódnia kell. Az emelkedést követően, a fotokémiai és hődisszipációs folyamatok eredményeképp a fluoreszcencia kioltódik, és végül eléri az F_t steady-state értéket. A telítő fényimpulzusok állandó megvilágítás mellett való alkalmazása lehetővé teszi a fényadaptált állapot maximális fluoreszcenciájának (F_m') meghatározását. Az F_m' az F_m -hez képesti csökkenése a nem-fotokémiai kioltás (NPQ = $(F_m - F_m') / F_m'$) jelenlétére utal. A fényadaptált állapothoz tartozó minimum fluoreszcencia (F_0') egy távoli vörös fényimpulzus segítségével mérhető meg. A PS II effektív kvantumhasznosítása (Yield) a PS II-asszociált klorofilok abszorbeálta fénynek azt a részét méri, mely fotokémiai munkavégzésre fordítódik: Yield = $(F_m' - F_t) / F_m'$. A fotokémiai kioltást (qP), azaz a nyitott reakciócentrumok arányát a $qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0')$ képlettel kaphatjuk meg.



A méréshez felhasznált oldatok és anyagok

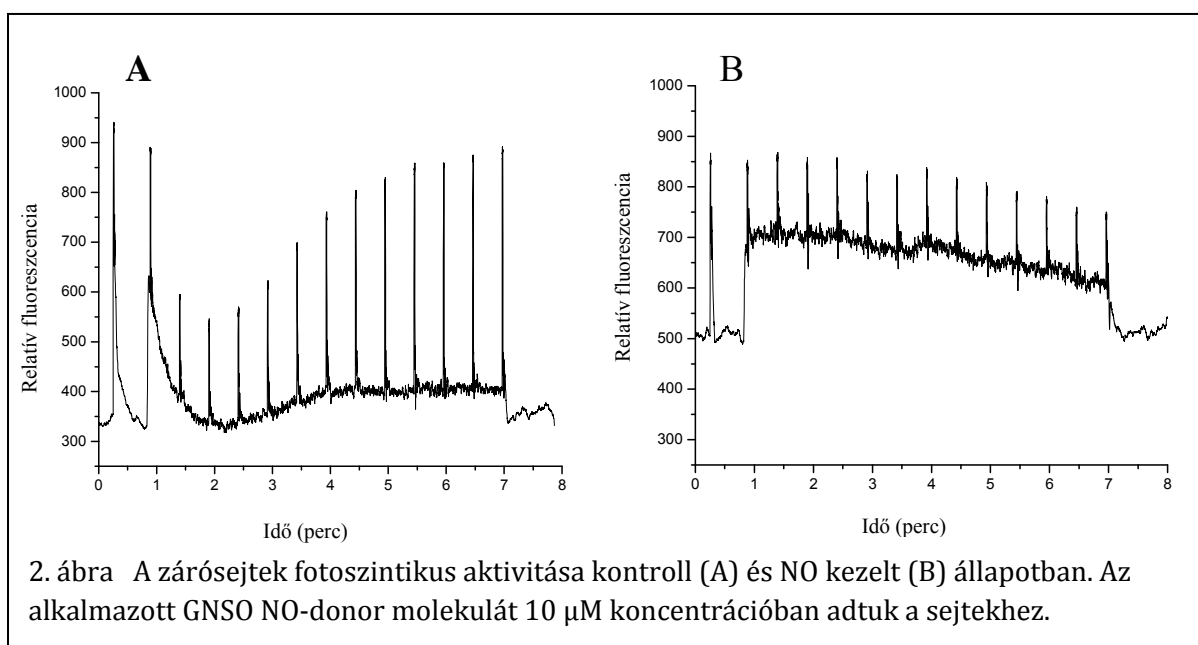
Az izolált protoplasztokat a mérésekig sötétben, jégen, alapoldatban (0,5 mM aszkorbinsav, 10 μ M KH_2PO_4 , 5 mM MES, 0,5 mM MgCl_2 , ozmolaritása 550 mOsm szorbitollal, pH 5,5 Tris-sel) tároltam. A mérések során, egy üveg aljú műanyag Petri-csészébe 200 μ l sejtszuszpenziót és 1,8 ml 4°C hőmérsékletű mérőoldatot (1 mM CaCl_2 , 10 mM MES, 4 mM MgCl_2 , 10 K-glutamát, 2,5 mM $\text{Na}_2(\text{HCO}_3)_2$, ozmolaritása 500 mOsm szorbitollal, pH 5,6 Tris-sel) helyeztem.

EREDMÉNYEK

Csoportunk korábbi, intakt leveleken végzett kísérletei alapján kiderült, hogy a NO megváltoztatja a mezofill sejtek fotoszintetikus aktivitását: csökkenti a fotokémiai- és nem fotokémiai kioltást és az effektív kvantumhasznosítást (Wodala és mtsai., 2008).

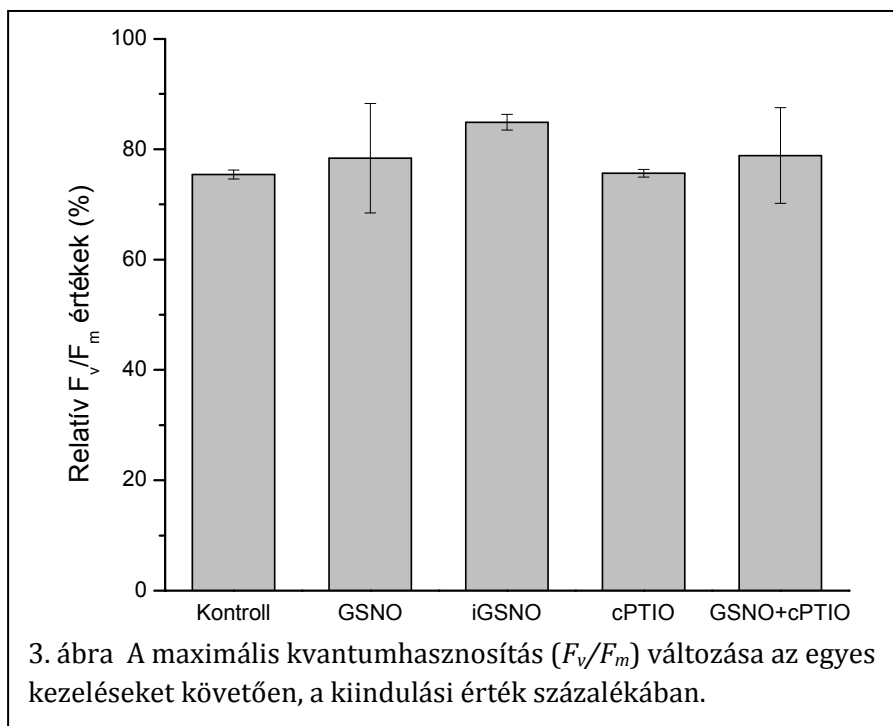
Kísérleteimben a zárósejt fotoszintetikus aktivitásának NO-függésére voltam kíváncsi, hisz a zárósejt a fotoszintézise során előállított ozmotikumokon keresztül közvetetten hozzájárul a sztóma nyitottságához. Ezért Microscopy-PAM módszerrel, egy-egy zárósejt protoplaszt környezetében a NO donor molekulák koncentrációját változtattam és quenching analízissel a különálló sejtek fotoszintetikus paramétereit megmértem.

A Petri csészébe helyezett sejteket 10 percig sötétadaptáltam, majd az F_O , F_m értékeket, és 7 perc aktinikus megvilágítás után a steady-state állapot qP, Yield és NPQ paramétereit meghatároztam. Az ötféle kísérletben a fotolabilis, 10 μM koncentrációjú GSNO NO-donort, a 20 μM cPTIO-t, a 20 μM cPTIO + 10 μM GSNO, és a fényinaktivált 10 μM iGSNO-t tartalmazó oldatokat ezután a sejtürdő oldathoz adtam, és $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fényel 15 percen keresztül megvilágítottam. 10 perc sötétadaptáció után a fentebbi mérést újra elvégeztem. A GSNO fény hatására bomlik (fotolízis), és a felszabaduló NO a sejtek membránjain átdiffundálva, közvetlenül képes a fotokémiai rendszereket alkotó fehérjék nitrozilálására. A NO hatása minden sejt esetén jellegzetes fluoreszcencia indukciós görbét ad, amelyet megnövekedett F_O , és F_t , csökkenő ΔF és NPQ jellemez (2. ábra).

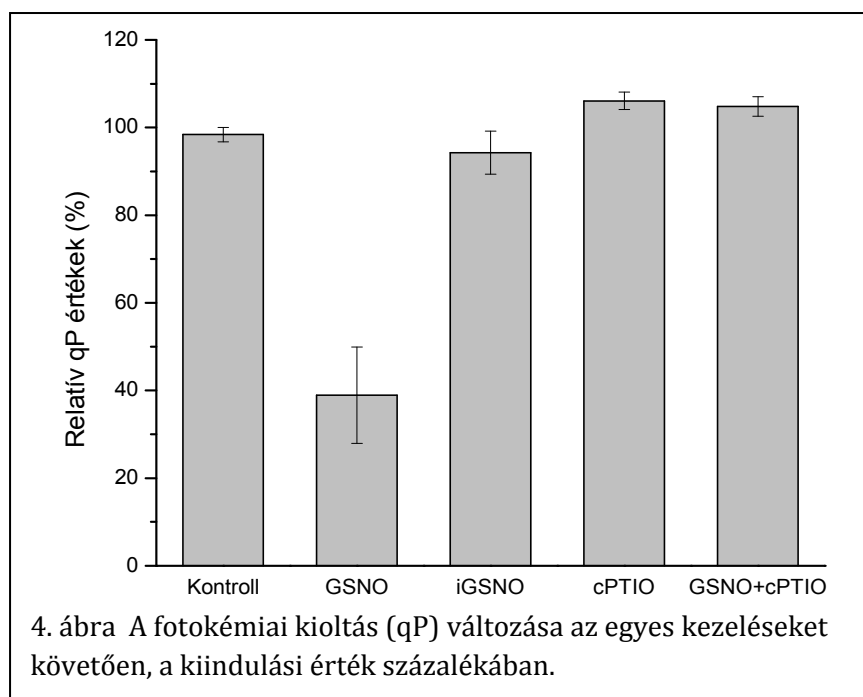


A változások kiderítésére a kontroll sejteket is $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fényel 15 percen keresztül világítottam meg, majd 10 perc sötétadaptáció után a fentebbi mérést újra elvégeztem. Úgy találtam, hogy a maximális kvantumhasznosítás csökkenése, amely az F_O növekedésének és F_m csökkenésének az oka, nem a NO hatásával értelmezhető (3. ábra).

Megállapítottam, hogy minden egyes esetben közel azonos volt a csökkenés (~20%), mely a reakciócentrumok inaktivációjának köszönhető. A protoplasztokat ugyanis integritásuk megőrzéséhez jégen kell tartani, ám ez a mérések során nem kivitelezhető. A szobahőmérsékletű mérőoldat hozzájárulhat az F_v/F_m csökkenéséhez.

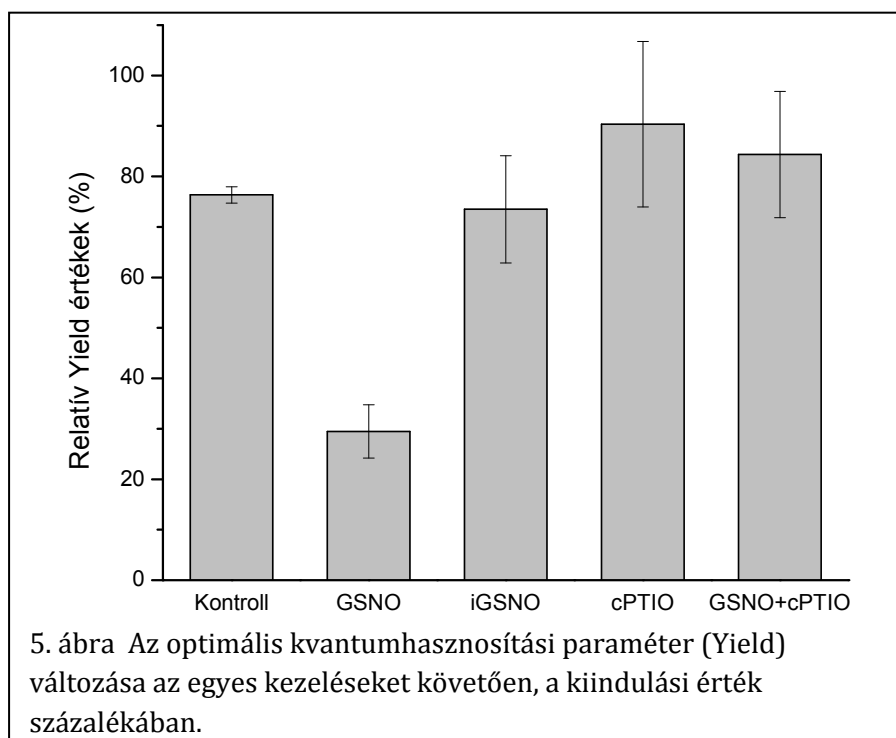


A fotokémiai kioltás a nyitott reakciócentrumok részarányát mutatja (4. ábra).

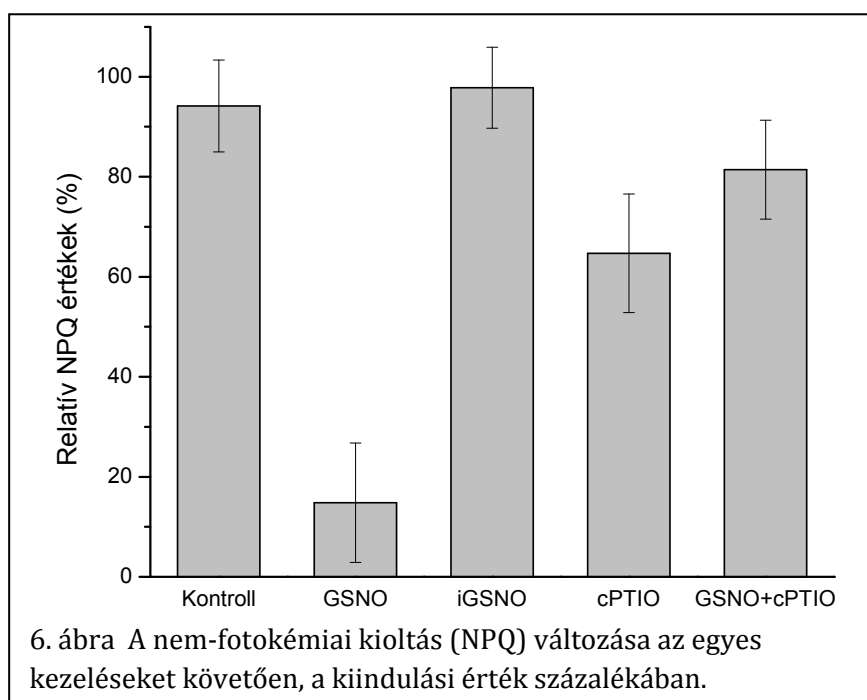


qP értéke a kontroll esetben nem változott, ezzel szemben a NO hatására jelentősen csökkent a kiindulási állapothoz képest (~0,9-ről 0,4-re). Ennek magyarázata lehet a mezofill sejtekben is megfigyelt Q_A és Q_B molekulák közötti nem-hem vashoz való kapcsolódás, mely lassítja az elektronok átadását a plasztokinton pool felé, ezzel a Q_A redukáltsági fokát emelve zárja a reakciócentrumokat. A cPTIO hatására a qP esetében ~5 %-os növekedés volt megfigyelhető, mely feltételezhetően a sejtben alapállapotban megtalálható NO megkötése révén valósulhat meg.

Az effektív kvantumhasznosítás egyenesen arányos a Calvin-ciklus sebességével. Úgy találtam, hogy a zárósejtekben szintetizálódó cukrok mennyiségét a NO jelenléte befolyásolhatja, mert a Yield értékét erőteljesen lecsökkentette (5. ábra). Ugyanez NO-kötő cPTIO és fényinaktivált GSNO jelenlétében nem volt megfigyelhető.



A nem fotokémiai kioltás a gerjesztési energia hő formájában való disszipációját mutatja, mely a tilakoid lumen savanyodásával szoros kapcsolatban áll. NO hatására az NPQ a kontroll értékéhez képest jelentősen csökken, ami a lument protonokkal dúsító, lineáris elektrontranszportlánc sebességének csökkenésével magyarázható (6. ábra).



Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a mezofill sejtekhez hasonlóan, a NO fotoszintézisre gyakorolt hatása zárósejtekben is a második fotokémiai rendszerhez köthető. A NO csökkenti az effektív kvantumhasznosítást, valamint a fotokémiai és nem-fotokémiai kioltást. Arra következtettem, hogy a NO fotoszintézist gátló hatása miatt kevesebb ozmotikusan aktív cukor és kevesebb ATP képződhet. Ez utóbbi a plazmamembrán alacsonyabb mértékű hiperpolarizációját eredményezi, mellyel a gázcsere nyitódását akadályozza.

4. Összefoglalás

A zárósejtek működésének és szabályozásának felderítése kapcsán ma is rengeteg új eredmény születik, hisz az élettani kutatások módszerei között nemcsak az elektrofiziológiai, hanem a legfrissebb molekuláris biológiai módszerek is rendelkezésre állnak. Kutatócsoportunk egy növényekben újonnan felfedezett hormon, a nitrogén monoxid jelátvitelben betöltött szerepével foglalkozik a sztómaműködés tekintetében.

Kutatásom egyik témája a zárósejtek Shaker-típusú, homotetramer KAT1 kálium-csatornájának vizsgálata és NO-függésének felderítése volt. Ebből a célból HEK293 gazdasejteket KAT1 gént tartalmazó vektorral transzfektáltam, és az expresszálandó fehérje monomerekből kialakuló, funkcionális, homotetramer kálium-csatornákat NO-dal kezeltem. NO donor molekulaként fényérzékeny S-nitroso-glutationt (GSNO) alkalmaztam, melynek vizes oldatát $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényel világítottam meg, és a felszabaduló NO mennyiségét NO-elektróddal detektáltam.

Patch clamp whole-cell módszer alkalmazásával megállapítottam, hogy a GSNO-ból felszabaduló NO közvetlenül, a csatornaféhrje S-nitrozilációján keresztül nincs hatással a KAT1 homotetramer fehérjére. Mivel NO hatására Ca^{2+} szabadul fel a sejt belső Ca^{2+} raktáraiból, kíváncsi voltam a KAT1 homotetramer csatorna Ca^{2+} -függésére, az esetleges közvetett hatás feltárásához. Azt tapasztaltam, hogy az ioncsatorna sem az extracelluláris, sem az intracelluláris oldal felől sem Ca^{2+} -függő. A NO csatorna-foszforyláción keresztül való hatásának kiderítése a jövőben megvalósítandó céljaim között szerepel.

A zárósejtek turgorát, így a sztómányílás méretét a fotoszintézisük során keletkező szacharóz és malát mennyisége is meghatározza. Kutatócsoportunk intakt levelek esetében bizonyította a NO fotoszintetikus aktivitást csökkentő hatását, további célunk ugyanennek zárósejtben való vizsgálata volt. Fotoszintetikusan aktív *Arabidopsis thaliana* zárósejt protoplastok egyedi fluoreszcencia indukciós kinetikája és quenching analízise alapján megállapítottam, hogy bár a maximális kvantumhasznosítás a kontrollhoz képest szignifikánsan nem változik, a fotokémiai és nem-fotokémia kioltások, valamint az optimális kvantumhasznosítás jelentős csökkenést mutat. Az eredmények alapján arra következtettem, hogy a NO fotoszintézist gátló hatása miatt kevesebb ozmotikusan aktív cukor és kevesebb ATP képződhet, mely utóbbi a plazmamembrán alacsonyabb mértékű hiperpolarizációját eredményezve, a zárósejtek kálium felvételét, így a gázcsere nyitódását megakadályozza.

Irodalmi hivatkozások

- Blatt MR** (1985) Extracellular Potassium Activity in Attached Leaves and Its Relation to Stomatal Function. *J Exp Bot* **36**: 240-251
- Diner BA, Petrouleas V** (1990) Formation by NO of Nitrosyl Adducts of Redox Components of the Photosystem-II Reaction Center. 2. Evidence That HCO₃⁻ CO₂ Binds to the Acceptor-Side Non-Heme Iron. *Biochim Biophys Acta* **1015**: 141-149
- Duby G, Hossy E, Fizames C, Alcon C, Costa A, Sentenac H, Thibaud JB** (2008) AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant J* **53**: 115-123
- Eghbali M, Olcese R, Zarei MM, Toro L, Stefani E** (2002) External pore collapse as an inactivation mechanism for Kv4.3 K⁺ channels. *J Membrane Biol* **188**: 73-86
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *P Natl Acad Sci USA* **100**: 11116-11121
- Hertel B, Horvath F, Wodala B, Hurst A, Moroni A, Thiel G** (2005) KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *Journal of experimental botany* **56**: 3103-3110
- Hill AC, Bennett JH** (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. **4**: 341-348
- Horvath F** (2007) A nitrogén monoxid szerepe a sztómaműködés szabályozásában. *In* 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p 39
- Horvath F, Erdei L, Wodala B, Homann U, Thiel G** (2002) K⁺ outward rectifying channels as targets of phosphatase inhibitor deltamethrin in *Vicia faba* guard cells. *J Plant Physiol* **159**: 1097-1103
- Hoshi T** (1995) Regulation of Voltage-Dependence of the KAT1 Channel by Intracellular Factors. *J Gen Physiol* **105**: 309-328
- Ivashikina N, Deeken R, Fischer S, Ache P, Hedrich R** (2005) AKT2/3 subunits render guard cell K⁺ channels Ca²⁺ sensitive. *J Gen Physiol* **125**: 483-492
- Lum HK, Lee CH, Butt YKC, Lo SCL** (2005) Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean). *Nitric Oxide-Biol Ch* **12**: 220-230
- Moroni A, Viscomi C, Sangiorgio V, Pagliuca C, Meckel T, Horvath F, Gazzarrini S, Valbuzzi P, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G** (2002) The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K⁺ channel Kcv. *Febs Lett* **530**: 65-69
- Muhling KH, Lauchli A** (1999) Effect of K⁺ nutrition, leaf age and light intensity on apoplastic K⁺ in leaves of *Vicia faba*. *J Plant Nutr Soil Sc* **162**: 571-576
- Ordog A, Wodala B, Horvath F** (2008) Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure. *Acta Biol Szeged* **52**: 163-165
- Ramon L, Munoz F, Gonzalez C, Cosmelli D** (2003) Structure and function of potassium channels in plants: some inferences about the molecular origin of inward rectification in KAT1 channels (Review). *Mol Membr Biol* **20**: 19-25
- Sanakis Y, Goussias C, Mason RP, Petrouleas V** (1997) NO interacts with the tyrosine radical Y-D(center dot) of photosystem II to form an iminoxyl radical. *Biochemistry-U S* **36**: 1411-1417

- Schansker G, Goussias C, Petrouleas V, Rutherford AW** (2002) Reduction of the Mn cluster of the water-oxidizing enzyme by nitric oxide: Formation of an S-2 state. *Biochemistry-Us* **41**: 3057-3064
- Sokolovski S, Blatt MR** (2004) Nitric oxide block of outward-rectifying K⁺ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol* **136**: 4275-4284
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR** (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* **43**: 520-529
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *P Natl Acad Sci USA* **98**: 2917-2921
- Takahashi S, Yamasaki H** (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *Febs Lett* **512**: 145-148
- Vergara C, Alvarez O, Latorre R** (1999) Localization of the K⁺ lock-in and the Ba²⁺ binding sites in a voltage-gated calcium-modulated channel - Implications for survival of K⁺ permeability. *J Gen Physiol* **114**: 365-376
- Wodala B, Deak Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horvath F** (2008) In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiol* **146**: 1920-1927
- Wodala B, Horvath F** (2008) The effect of exogenous NO on PSI photochemistry in intact pea leaves. *Acta Biol Szeged* **51**: 243-245
- Yang JD, Zhao HL, Zhang TH, Yun JF** (2004) Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition. *Acta Bot Sin* **46**: 1009-1014
- Zhou YF, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R** (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 angstrom resolution. *Nature* **414**: 43-48