

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A NITROGÉN-MONOXID HATÁSA BORSÓLEVELEK
FOTOSZINTETIKUS
ELEKTRONTRANSPORTJÁRA**

Wodala Barnabás



Témavezetők:

Dr. Horváth Ferenc
egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Erdei László
egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék

Szeged, 2009

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A nitrogén-monoxid (NO) szabadgyök apoláros, gáz halmazállapotú molekula, mely a növényekben többféle enzimátikus folyamatban, valamint nem enzimátikus úton is képződik. Sokrétű élettani szerepét növényekben tudományos közlemények sora bizonyítja, melyek nyomán ismert, hogy a NO szerepet játszik a növények legkülönbözőbb anyagcsere- és fejlődési folyamataiban, valamint az egyes biotikus stresszorok elleni védekezési reakciókban és számos abiotikus stresszválaszban is.

A NO kis molekulatömege, rövid féléletideje és egyéb kémiai tulajdonságainak köszönhetően ideális jelátvivő molekula. Sokoldalúságának lényeges eleme, hogy kölcsönhat számos fontos intracelluláris szignálmolekulával, köztük a kalciummal, ugyanakkor könnyen reagál oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolszurocsoportokkal és átmeneti fémekkel is. A fotoszintetikus és mitokondriális elektrontranszportlánc egyes komplexei között sok átmenetifém-tartalmú fehérje található, és korábbi *in vitro* valamint *in vivo* kutatások bizonyítják, hogy a NO hatást gyakorol a növények fotoszintetikus apparátusára és folyamataira. Izolált tilakoid membránokon NO-gázzal végzett EPR és klorofill-*a* fluoreszcencia kísérletek egyértelműen kimutatták, hogy a NO a PSII több pontjához reverzibilis módon kötődve gátolja PSII elektronátadási folyamatait. Izolált kloroplasztiszokon valamint intakt levelekben a különböző NO donormolekulák azonban eltérő módon befolyásolták a fluoreszcencia indukciós paramétereket.

Ezt az ellentmondást részben az okozhatja, hogy a NO hatásának vizsgálatára igen gyakran alkalmazott NO donormolekulák kémiai tulajdonságai, így NO produkciójuk különbözik, sőt lebomlásuk során más biológiai aktivitással rendelkező anyag is keletkezhet. Ugyanakkor a NO pontos kvantifikálása, különösen *in vivo* igen nehéz feladat.

Munkánk célja, hogy különböző NO donorok (SNAP, SNP és GSNO) és NO akceptormolekulák (PTIO és Hb) alkalmazásával vizsgáljuk az exogén NO kezelés hatását borsó levélkorongok fotoszintetikus elektrontranszportjára. E cél fontos része a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásáról szóló ellentmondásos eredmények tisztázása, és a NO *in vivo*

hatásterületeinek feltárása fluoreszcencia indukciós mérések segítségével. Célkitűzésünk másik fontos része a NO PSI működésére gyakorolt esetleges hatásának vizsgálata a P700 abszorpciós tranziensek mérésével. Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre keresünk választ:

1, Méréseinkben alkalmazott NO donorok eltérő kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek: van-e különbség az egyes NO donorok NO produkciójában? A képződő NO-molekulán túl befolyásolják-e mérési eredményeket az egyes donorok egyéb fotolitikus bomlástermékei, vagy maga a NO oxidatív bomlástermékei (nitrit- és nitrátionok)?

2, Tilakoid membránokon végzett EPR mérések igazolták, hogy a NO gátolja PSII elektronátadási folyamatait az alábbi helyeken: a Q_A és Q_B kötőhely között található nem-hem (II) vas, a vízbontó komplex melletti Y_D -tirozin gyök és a vízbontó komplex Mn-csoportja. Vajon ezek a hatások és célterületek *in vivo* környezetben is igazolhatók?

3, Az exogén NO fotoszintetikus paraméterekre gyakorolt hatását több NO donormolekulával izolált kloroplasztiszokon és intakt levelekben is vizsgálták: a SNAP tilakoid membránokban nem befolyásolja az F_v/F_m értéket, viszont csökkenti a fényindukált ΔpH mértékét. Ám intakt burgonya levelekben az SNP csökkenti az F_v/F_m értéket és nem befolyásolja a ΔpH -függő NPQ mértékét. A kapott különbségek mennyiben magyarázhatók az alkalmazott NO donormolekulák, és mennyiben a kísérleti elrendezés különbségeivel? Milyen hatást gyakorol az exogén NO borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereire?

4, A NO PSI elektronátadási folyamataira gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták. Befolyásolja-e az exogén NO PSI fotoszintetikus elektronforgalmát?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi anyag: két hetes *Pisum sativum* L. cv Rajnai Törpe növények legfiatalabb, teljesen kiterült leveleiből vágott 15 mm átmérőjű levélkorongok.

Kezelés: mérések előtt a levélkorongokat Petri-csészébe helyeztük és 2 órán keresztül inkubáltuk $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD fényintenzitáson, desztillált vízben, vagy NO donorok és akceptorok különböző koncentrációjú oldatában. A levélkorongokat ezután 15 percig sötétadaptáltuk.

A NO koncentráció meghatározása amperometriás úton, NO elektród segítségével (ISO-NOP, World Precision Instruments, USA).

Q_A -reoxidáció vizsgálata a klorofill-*a* fluoreszcencia flash-indukált lecsengésének nyomonkövetésével kettős modulációjú fluoriméter (PSI Instruments, Brno, Csehország) segítségével.

Fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása a különböző megvilágítás nyomán indukálódó fluoreszcencia mérésével PAM fluoriméter (PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) segítségével.

PSI fotoszintetikus aktivitásának vizsgálata a P700 abszorpciós tranziensek nyomonkövetésével, egy kettős hullámhosszú emitter-detektor egységgel (ED-P700DW, Walz) felszerelt PAM fluoriméter (PAM-101, Walz, Effeltrich, Németország) és egy Dual-PAM-100 (Walz, Effeltrich, Németország) segítségével.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

1. A NO donorok NO produkciója eltér

Munkánk során alkalmazott három NO donormolekula fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálata előtt fontosnak tartottuk kideríteni, hogy ezek a kémiaailag különböző NO donorok kísérleti rendszerünkben milyen NO emissziós sajátosságokkal rendelkeznek, illetve bomlástermékeik, vagy a NO oxidatív bomlástermékei befolyásolják-e a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereit.

A kísérleti kezelésünkben alkalmazott két órás megvilágítás során a SNAP oldat NO produkciója volt a legalacsonyabb, és fluoreszcencia indukciós mérésekben nem okozott változást a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereiben sem. A SNAP tehát nem bizonyult alkalmas donormolekulának kísérleti elrendezésünkben.

A fennmaradó két donor – az SNP és a GSNO – oldatainak NO koncentrációja még két óra elteltével is jelentős, s ezt a NO mennyiséget mindkét általunk alkalmazott NO akceptormolekula hatékonyan csökkentette. A NO specifikus hatásának bizonyításához megvizsgáltuk a nitrit- és nitrát-ionok, valamint a GSNO fotolízisekor keletkező GSSG hatását. Kiderült, hogy a nitrit- és nitrátkezelés, valamint a GSSG szintén nem okoznak változást a levélkorongok F_v/F_m , qP, és NPQ paramétereiben, ám az SNP által indukált változások részben cianidnak köszönhetőek, mely a NO mellett szintén felszabadul a donormolekulából. A GSNO-kezelés hatásáért azonban kizárólag a NO felel.

Ezek az eredmények hangsúlyozzák a megfelelő NO donormolekula megválasztásának fontosságát, illetve igazolják a GSNO alkalmasságát a NO *in vivo* fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálatára.

2. A NO PSII elektrontranszport folyamatait donor és akceptor oldalon is gátolja *in vivo*

GSNO-val kezelt borsó levélkorongokon végzett Q_A -reoxidációs mérések segítségével feltérképeztük a NO kötőhelyeit PSII-ben. A GSNO-kezelés emeli a lecsengési kinetika középső fázisának amplitúdóját és növeli időállandóját ami azt jelzi hogy a NO csökkenti az elektrontranszport sebességét Q_A és Q_B között, így valószínűsíthető, hogy a NO *in vivo* is kompetitíven kötődik a nem-hem (II) vashoz. A GSNO DCMU jelenlétében gátolja a fluoreszcencia teljes lecsengését, azaz akadályozza a töltésrekombinációt Q_A és az S_2 állapotú vízbontó komplex között, mert redukálja, vagy inaktiválja a Mn csoportot, esetleg redukálja a Y_D tirozin gyököt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NO gátolja PSII donor és akceptor oldali elektronátadási folyamatait intakt levelekben is.

A donor és akceptor oldali gátlást a Kautsky-görbe kinetikája is alátámasztja: GSNO-kezelés hatására a Kautsky-görbe F_I pontja emelkedik, az F_P szint és F_I - F_P görbe maximális meredeksége viszont jelentősen csökken.

3. A NO módosítja a fotoszintetikus paramétereket

Fluoreszcencia indukciós mérésekből kiderül, hogy a GSNO-kezelés hatására csökkent a borsó levélkorongok F_v/F_m hányadosa, a qP , azaz a NO növeli a zárt PSII reakciócentrumok arányát. Az eredmények megerősítik a fluoreszcencia lecsengés kinetikájából és a gyors fluoreszcencia indukciós mérésekből nyert adatokat, amelyek a Q_A -molekula (zárt reakcióközpontok) felhalmozódására utalnak. A GSNO emellett az NPQ értékét is csökkenti, ami jelzi, hogy a NO gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot *in vivo*. A közvetlen gátlás mellett közvetett hatások sem zárhatók ki: a NO gátolhatja a Rubisco aktiválódását és aktivitását; emellett szuperoxid-anionnal reakcióba lépve peroxinitritet képezhet, mely szintén gátolhatja a fotoszintetikus elektrontranszportot, ugyanakkor membránkárosító hatása is van.

A GSNO-kezelés növeli a sötétadaptált levelek megvilágításának első perceiben jelentkező reakciócentrum típusú nemfotokémiai kioltást, vélhetően a ciklikus elektrontranszport fokozása illetve a Calvin-ciklus aktivációjának késleltetése útján.

4. A NO kismértékben serkenti PSI elektronforgalmát

Noha a NO nem módosította a Φ_{PSI} értékét, kis mértékben emeli a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletét, melynek háttérében a PSI körüli ciklikus elektrontranszport mérsékelt serkentése állhat.

Munkánk eredményei összességében megerősítik és új eredményekkel egészítik ki a korábbi *in vitro* eredményeket, így hozzájárulnak a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának tisztázásához. A NO fotoszintetikus elektrontranszportban betöltött potenciális reguláló szerepe azonban korántsem feltérképezett terület. Bízunk benne, hogy a további ígéretes kutatási lehetőségek kijelölésében, kérdések megfogalmazásában talán ez a munka is segítséget nyújt.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

(* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

Folyóiratcikkek:

Hertel B, Horváth F, **Wodala B**, Hurst A, Moroni A, Thiel G. (2005) KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *Journal of Experimental Botany*. **56**: 3103-10. IF: 3,336

Horváth 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. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 1097-103. IF: 1,149

***Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horváth F. (2008) Involvement of NO in the regulation of photosynthetic electron transport *in vivo* studied by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Physiology*. **146**: 1920-7. IF: 6,367

Referált folyóiratban megjelent összefoglalók

Horváth F, Erdei L, **Wodala B**, Homann U, Thiel G. (2002) Deltamethrin rescues run down of K⁺ outward rectifying channels in *Vicia faba* guard cells. *Acta Biologica Szegediensis*. **46**: 19-20.

Horváth F, **Wodala B**, Erdei L, Moroni A, Van Etten J, Thiel G. (2002) pH-dependent regulation of a potassium channel protein encoded by a *Chlorella* virus PBCV-1. *Acta Biologica Szegediensis*. **46**: 21-2.

Ördög A, **Wodala B**, Horváth F. (2008) Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure. *Acta Biologica Szegediensis*. **52**: 163-5.

***Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Horváth F. (2005) Nitric oxide modifies photosynthetic electron transport in pea leaves. *Acta Biologica Szegediensis*. **49**: 7-8.

***Wodala B**, Horváth F. (2008) The effect of exogenous NO on PSI photochemistry in inact pea leaves. *Acta Biologica Szegediensis*. **52**: 243-5.

Poszterek

***Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Horváth F. (2005) Nitric oxide targets photosynthetic electron transport in pea leaves. "Photosynthesis and Stress" Central European Conference on Biophysical and Biochemical Methods in Photosynthesis Research, 2005. szeptember 15-16., Brno, Csehország.

***Wodala B**, Horváth F, Deák Z, Vass I, Erdei L. (2006) Nitric oxide hinders photosynthetic electron transport in pea leaves. XV. FESPB Congress, 2006. július 17-21., Lyon, Franciaország.

Konferencia előadások

Wodala B, Horváth F, Erdei L, Thiel G. (2005) pH-dependent regulation of the virus-encoded miniature potassium channel, Kcv. 5th International Conference of PhD Students, 2005. augusztus 14-20., Miskolc, Magyarország

Wodala B, Horváth F, Moroni A, Thiel G. (2003) pH-dependent regulation of potassium channel protein encoded by Chlorella virus, PBCV-1. XXXIII. Membrán-transzport konferencia, 2003. május 20-23., Sümeg, Magyarország.

NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Wodala Barnabás

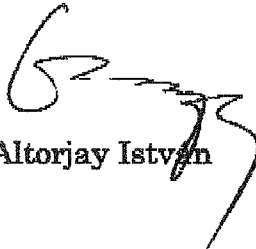
Hertel B, Horváth F, Wodala B, Hurst A, Moroni A, Thiel G. (2005) KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *Journal of Experimental Botany*. 56: 3103-10. IF: 3,336

valamint

Wodala B, Deák Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horváth F. (2008) Involvement of NO in the regulation of photosynthetic electron transport *in vivo* studied by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Physiology*. 146: 1920-7. IF: 6,367

címmel megjelent közleményekben végzett munkája meghatározó jelentőségű, és ezen közleményeket mindeddig nem használtuk fel tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére, mint ahogyan azt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2009. szeptember 1.



Dr. Altorjay István



Dr. Deák Zsuzsanna



Dr. Vass Imre



Prof. Dr. Erdei László



Dr. Horváth Ferenc