

Ph.D. disszertáció tézisei

**A mitokondriális elektrontranszportot befolyásoló Arabidopsis
PPR40 fehérje szerepe az abiotikus stresszválaszokban**

Zsigmond Laura

Témavezető: Dr. Szabados László

Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport
Növénybiológiai Intézet

Magyar Tudományos Akadémia,
Szegedi Biológiai Központ

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2008

Bevezetés

A növények, az összes többi élőlényhez hasonlóan, számtalan környezeti hatásnak (szárazság, hőmérséklet-változás, erős fény, tápanyaghiány, stb.) vannak kitéve életük során. E hatások gyakran az optimális életkörülményektől kisebb-nagyobb mértékben eltérőek lehetnek (környezeti stressz), ezzel alkalmazkodásra készítetve a helyhez kötött életmódot folytató növényeket. A mitokondriumok minden eukarióta sejtben megtalálható, egyik legfőbb energiatermelő organelumok, melyek a sejteken belüli energia és redox egyensúly fenntartásában a központi szabályozást látják el. A mitokondriumokhoz szorosan kapcsolódik számos olyan anyagcsere útvonal, amelyek jelentősek a növények környezeti változásokhoz való alkalmazkodásában. Anyagcseréjük központjában a sejtlégzés folyamata áll; az itt lezajló folyamatok alatt nagy mennyiségű energia szabadul fel az elektron transzport láncon zajló terminális oxidáció során, ami adenzin-trifoszfát (ATP) képződésére fordítódik. Az elektrontranszport folyamata során a NADH-ról az I komplex (NADH-dehidrogenáz) közvetítésével, a FADH₂-ről a II komplexen (szukcinát-dehidrogenáz) keresztül jut el az elektron az ubikinonig. Az ubikinonról a III komplexen (citokróm c redukáz) és a citokróm c-n halad tovább az elektron, majd a IV komplexen (citokróm c oxidáz) eljut a végső elektron akceptorhoz, az O₂-hez. A citokrómokon keresztüli elektrontranszport gátlásakor (cianid rezisztens légzés) az alternatív oxidázok (AOX) segítenek fenntartani az elektronáramlást és a citrát ciklus működését még az oxidatív foszforiláció hiányában is.

A növényi mitokondriális elektronszállítás egyik lényeges tulajdonsága, hogy semlegesíti a fotoszintézis redukáló kapacitásának a feleslegét, miközben megvédi a tilakoid membránokat és más sejtalkotókat az oxidatív károsodásoktól. Ezen kívül a mitokondriális elektron transzport részt vesz a reaktív oxigén formák (ROS) termelésben különböző biotikus és abiotikus

stressz körülmények között. Az elektronszállítási láncban az I komplex és a III komplex a fő helye a ROS képződésének. A képződött ROS-ok károsíthatják a sejtszerkezetet, makromolekulákat, nuklein savakat, fehérjéket és lipideket. Emellett jelátvivő mechanizmusok fontos elemei lehetnek befolyásolva egyedfejlődési és adaptációs folyamatokat. Más jelátvivő molekulákkal kölcsönhatásban a ROS-ok szabályozhatják a fehérjék stabilitását és a génkifejeződést.

A penta-trikopeptid domént (PPR: pentatricopeptide repeat) tartalmazó fehérje család csak eukariótákban fordul elő. Növényekben nagy számban fordulnak elő PPR fehérjék, amelyek 35 konzervált aminosavból álló 9-15 tandem ismétlődő PPR domént tartalmaznak. A PPR ismétlődések helikális szerkezetet alkotnak, és ezeket a szakaszokat tartják az RNS kötésért felelős résznek. Habár néhány PPR gént már azonosítottak az elmúlt években és ismert az is, hogy ezen fehérjék jórészt a mitokondriumban és/vagy a kloroplasztisban lokalizálódnak, a legtöbb PPR fehérje biológiai szerepe még nem tisztázott. A PPR fehérjék befolyásolhatják az organelláris génkifejeződés szabályozását kontrollálva az RNS metabolizmus különböző aspektusait, mint például az RNS érése és translációja. Néhány PPR gén mutációjának következtében a növények embrióletalitást, csökkent fertilitást és törpe fenotípust mutatnak ami arra utal, hogy ezeknek a fehérjéknek fontos szerepük van a növények növekedésében és egyedfejlődésében.

Célkitűzések

Csoportunkban korábban azonosított *Arabidopsis thaliana* T-DNS inszerciós mutáns növény részletes jellemzését írom le. A mutáció következtében a vizsgált növény csökkent növekedésű volt és fokozott érzékenységet mutatott abszcizinsavval szemben. Ennek a mutánsnak a részletes

vizsgálatával szeretnénk jellemezni a mutáció által érintett gén funkcióját, és feltérképezni a génhez kapcsolódó szabályozási utakat. A részletes jellemzésnél a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

- a vizsgált mutáns mutat-e más abiotikus (például oxidatív) stresszel szemben is megváltozott érzékenységet;
- a T-DNS beépülés következtében inaktiválódik-e az adott gén, illetve ez összefüggésben van-e a stresszre adott válaszreakciókkal;
- helyreállítható-e a mutáns megváltozott fenotípusa a gén túltermeltetésével;
- milyen sejten belüli lokalizációt mutat az adott gén által meghatározott fehérje;
- milyen összefüggésben van a fehérje lokalizációja a mutáns stresszérzékenységével?

Anyagok és módszerek

- Növény anyag és nevelési körülmények
- *ppr40-1* és *ppr40-2* inszerciós mutánsok azonosítása és jellemzése
- RNS izolálás és génexpressziós vizsgálatok
- Mitokondrium tisztítás, fehérje izolálás és immunoblot analízis
- Immunfestési eljárások
- Mitokondriális fehérje komplexek elválasztása cukorgrádienssel és két-dimenziós Blue-Native/SDS gélelektroforézissel
- Fehérjék azonosítása tömegspektroszkópiával
- Hidrogén-peroxid kimutatása növényekben
- Lipidperoxidáció mérése
- Abszcizinsav tartalom meghatározása

- Enzimaktivitások fotometriás mérése (aszkorbát peroxidáz, szuperoxid dizmutáz, citokróm c oxidáz)
- Sztómazáródási vizsgálat
- Aszkorbinsav fogyasztás és légzés vizsgálata mitokondriumban

Eredmények és Megvitatásuk

T-DNS inszerciós mutagenézis programunk során (Szabados és mtsai., 2002) azonosítottuk a *ppr40-1* transzgenikus *Arabidopsis* mutánst, melynél a mutáció következtében abszcizinsav (ABS) érzékenységet és csökkent méretet figyeltünk meg. A *ppr40-1* jellemzésekor igazoltuk egy tandem fordított T-DNS beépülést az *At3g16890* gén átíródó régiójába. A T-DNS az ATG kodontól 311 bázispárnyira a 3' irányba épült be. Megvizsgáltunk egy másik allélt is, amelyhez a SALK inszerciós mutáns gyűjteményből jutottunk hozzá, és amit *ppr40-2*-nek neveztünk el. Ennél a mutánsnál a T-DNS beépülés az ATG kodontól 852 bázispárnyira volt 3' irányban. A PPR40 fehérje 14 konzervált domént tartalmaz, a PPR-ek két doménban (5 és 9) különülnek el. A *ppr40-1* növények rozetta leveleinek mérete 50-60%-kal, míg a *ppr40-2* növények rozetta levelei 20%-kal voltak kisebbek, mint a vad típusú növényeké. A magok csírázása a mutáns növényeknél egy kissé későbbre tolódik; miközben a vad növény magjainak 100%-a kicsírázik a negyedik napra, a *ppr40-1* és *ppr40-2* növények magjainak kicsírázása eltolódik kettő, illetve egy nappal. Mivel munkánk kezdetén a *ppr40-1* mutáns ABS érzékenysége miatt lett kiválasztva, megvizsgáltuk a másik allél esetében is a ABS hatását. 0.5 μ M ABS-val kiegészített táptalajon csíráztatott *ppr40-1* és *ppr40-2*-nél hét nap elteltével a 20%-a illetve 60%-a csírázott ki a magoknak, míg a vad allél esetében ez az arány 98% volt. A fenotípusbeli eltérés a rozetta növekedésében és az ABS érzékenységben azt mutatja, hogy a *ppr40-1* feltehetőleg a null allél, míg a

ppr40-2 esetében a mutáció egy részlegesen megváltozott "leaky" fenotípust okoz. Ennek egy lehetséges magyarázat az, hogy RT-PCR kísérletek alapján feltételezzük, hogy mind a *ppr40-1* mind a *ppr40-2* esetében egy C terminálisan csonkított fehérje íródik át. A *ppr40-1* allél esetében egyetlen PPR domént sem, míg a *ppr40-2* allél esetében 5 PPR domént is tartalmaz. A későbbi vizsgálatokhoz csak a *ppr40-1* mutáns növényeket használtuk. Mivel szeretnénk volna megvizsgálni a *PPR40* jelentőségét a környezeti tényezők változása és a növényi hormonokra adott válaszok szabályozásában, egy átfogó csírázási és növekedési teszt sorozatot végeztünk *in vitro* és üvegházi körülmények között. Az eredményeink azt mutatták, hogy a *ppr40-1* mutáns az abszcizinsavon kívül csak a NaCl-ra, ozmotikus stresszre és cukorra mutat fokozott érzékenységet.

A *ppr40-1* mutáció és az általa kiváltott fenotípusbeli változások közti összefüggés igazolására genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk: *PPR40-HA* gént *Agrobacterium*-közvetített transzformációval *ppr40-1* növényekbe juttattuk. A létrehozott transzgenikus növényeknél akár a csírázási képességet, akár a növekedési sebességet néztük, egymástól némileg eltérő mértékben, de minden esetben a vad típushoz hasonló fenotípust figyelhettünk meg. Evvel igazoltuk a T-DNS beépülése által kiváltott mutáció és a *ppr40-1* fenotípusa közötti összefüggést. A *PPR40* fehérje funkciójának további megismerése végett a *PPR40* gént túltermeltettük vad típusú növényekben. A *PPR40* túltermelő vonalak stressztűrő képességének teszteléséhez a növények csírázási képességét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a *PPR40* túltermelő növények fokozott toleranciát mutattak NaCl-al, glükózzal és ABS szemben. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a *PPR40* fehérjének fontos ozmotikus stresszel szembeni védő szerepe lehet.

A *ppr40-1* mutáns csírázási ABS érzékenységből kiindulva összehasonlítottuk az ABS indukálta sztómazáródást a vad és *ppr40-1* növényekben. A *ppr40-1* mutáns a növekvő ABS koncentrációkra szignifikánsan erősebben megnyilvánuló sztómazáródással reagált. A sztómák

nyitottsága befolyásolja a párologtatás mértékét, ezért megvizsgáltuk a *ppr40-1* és Col-0 levágott leveleinek vízvesztését szobahőmérsékleten szárítva azokat. A levágott *ppr40-1* levél vízvesztése szignifikánsan kisebb volt mint a vad típusúé. Megmértük a mutáns és vad növények szabad ABS tartalmát is. Mivel nem találtunk szignifikáns különbséget, az eredményeink arra utalnak, hogy nem a hormon bioszintézise, hanem az ABS jelátviteli út érintett a mutáció által. Ezért megvizsgáltunk néhány ABS-függő és ABS-független jelátviteli utakban ozmotikus stresszt hatására aktiválódó gén kifejeződését a *ppr40-1* mutánsban, és az eredményeink azt mutatták, hogy a PPR40-nek nincs közvetlen hatása a jelátviteli folyamatok elsődleges irányítására, bár a *ppr40-1* mutáció közvetetten befolyásolta ezeket a folyamatokat.

Miközben sóra és ozmotikus stresszre érzékeny a *ppr40-1* mutáns, a metilgloxállal szemben fokozott toleranciát mutatott csírázási és növekedési tesztekben. A metilglioxál lebontását a glioxaláz út enzimeit végzik, ami a növények esetében a glioxaláz I (*GLX1*) és a glioxaláz II (*GLX2*) enzimeket foglalja magába. Megvizsgáltuk néhány már jellemzett *GLX1* és *GLX2* gén kifejeződését vad és *ppr40-1* növényekben. A vizsgált glioxaláz géneknél megemelkedett expressziót tapasztaltunk, ami magyarázhatja a *ppr40-1* mutáns metilgloxállal szembeni rezisztenciáját.

A PPR40 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához PPR40-HA túltermelő növényeket felhasználva fehérjét izoláltunk különböző sejtiszervecskéből és teljes sejt kivonatból. A PPR40-HA a mitokondriumban volt kimutatható HA ellenanyag segítségével. A PPR40-HA mitokondriális elhelyezkedését immunolokalizációs vizsgálatokkal szintén igazoltuk. Ezután meghatároztuk a PPR40 fehérje pontos helyzetét a mitokondriumon belül, amihez a fehérje komplexek cukorgradiensén történő elválasztását és az ún. 2 dimenziós Blue-Nativ/SDS gélelektroforézist alkalmaztuk, illetve az ezeket követő western analízist. Mindkét esetben a PPR40-HA fehérje egy kb. 500 kDa tömegű komplexben volt kimutatható. Ez a méret megegyezett a mitokondriális

légzési lánc III komplexének tömegével. Tömegspektroszkópiás analízissel megállapítottuk, hogy a kérdéses komplexből azonosított fehérjék minden esetben a mitokondrium III komplex már ismert alegységei voltak. Teszteltük azt is, hogy a PPR40 fehérje hiánya okozott-e bármilyen változást az elektronszállítási lánc összetételében, de nem találtunk különbséget a vad és mutáns mitokondriumok légzési komplexeinek és a III komplex alegységeinek összetételében. Megvizsgálva a III komplex génjeinek mRNS szintjét azt tapasztaltuk, hogy a vad és a *ppr40-1* növények között egyik esetben sem volt kiugró különbség, a transzkript szintek jórészt megegyeztek. Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a PPR40 fehérje a III komplexhez kapcsolódva a mitokondriális elektron transzport lánc része, de annak összetételét nem befolyásolja.

A PPR fehérjék nagy számban vesznek részt az organelláris RNS érési folyamatok szabályozásában, ezért megvizsgáltuk, hogy a PPR40 befolyásolja-e a III komplex alegységeinek mRNS érését. Az apocitokrómban (*cob*) az egyetlen III komplex alegység, ami a mitokondriális genomon kódolódik, és egy 5 kb hosszúságú transzkriptként íródik át. Kísérleteink során nem találtunk különbséget a *ppr40-1* mutáns, vad típusú és komplementált növények között a *cob* transzkript méretében. Ezután megnéztük, hogy a *cob* mRNS szerkeztése megváltozott-e a *ppr40-1* mutánsban, ezért vad típusú és mutáns növényekből tisztított mitokondriális RNS mintákból teljes hosszúságú *cob* cDNS-t írtunk át. Nem találtunk semmilyen különbséget a vad és a mutáns növény *cob* cDNS szekvenciájában.

Annak érdekében, hogy a PPR40 szerepét megismerhessük az elektron transzport láncon belül, megvizsgáltuk az ezzel összefüggésbe hozható mitokondriális funkciókban bekövetkező lehetséges változásokat, mint például a különböző légzési szubsztrátok fogyasztását és a reaktív oxigénformák keletkezését. Először oxigén fogyasztást mértünk NADH-t használva elektron donorként, ami az I komplex szubsztrátja. Azt tapasztaltuk, hogy a *ppr40-1* mitokondriumok oxigén

fogyasztása 50%-kal kisebb, mint a vad mitokondriumoké. Ezután szukcinátot alkalmaztunk légzési szubsztátként ami a II komplex elektron donorja. Megfigyeltük, hogy azonos mennyiségű szukcinát hozzáadásakor a vad mitokondriumnál 40%-kal nagyobb O_2 fogyást mértünk mint a *ppr40-1* esetében. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy akár az I akár a II komplexen keresztül juttatjuk be a rendszerbe az elektront, az O_2 fogyás le fog csökkenni. Ezután megvizsgáltuk a IV komplex működését. Aszkorbinsavat használva szubsztrátként. Azonos mennyiségű aszkorbát hozzáadásakor az O_2 fogyasztás 2.5-3-szor több volt a *ppr40-1* esetében, mint a vad mitokondriumoknál. Mivel az O_2 fogyasztásban jelentős különbséget tapasztaltunk aszkorbát szubsztrát mellett, megvizsgáltuk azt is, hogy az aszkorbát fogyasztásban van-e különbség. Gyökérből tisztított *ppr40-1* mitokondriumok aszkorbát fogyasztása 25%-kal volt nagyobb, sejtszuspenziót használva pedig 50%-kal volt nagyobb, mint a vad mitokondriumoké. A IV komplexre jellemző enzimaktivitást, a citokróm-c oxidáz (COX) aktivitását is megmértük *ppr40-1* és vad mitokondriumokban, és azt tapasztaltuk, hogy a *ppr40-1* COX aktivitása kétszerese volt a vad típusúénak. Ezen eredményeinket összegezve már nem csak arra következtethettünk, hogy a IV komplex működőképes, hanem arra is, hogy a *ppr40-1* mutánsokban nagyobb hatékonysággal működik, mint a vad mitokondriumokban. Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a *ppr40-1* mutánsban sérült a elektronszállítási lánc (feltételezhetőleg a III komplexnél), de ennek ellenére a IV komplex elektron felvevő és továbbító képessége ép maradt, és fokozott működésével próbálja kompenzálni a sérülést.

Ha a III komplex lecsökkent citokróm c reduktáz aktivitással rendelkezik, az az elektronszállítás gátlásához és az ubikinon-poolban az elektronok felhalmozódásához vezet, ami ROS képződését eredményezheti. Az alternatív oxidázok (AOX) lecsökkentik a ROS felhalmozódását stressz hatására. Megvizsgáltuk az AOX aktivitását, és 40%-kal nagyobb aktivitást mértünk a

ppr40-1 esetében mint a vad típusnál. Összehasonlítottuk a *ppr40-1* és vad növények stresszválasz-specifikus *Aox1d* transzkript szintjét is. Az *Aox1d* transzkript szintje szintén nagyobb volt a *ppr40-1*-ben mint a vad típusban. Az eredményeink arra utalhatnak, hogy az alternatív légzési útvonal fokozott működésével próbálja kiegyenlíteni a III komplex elektronszállítási zavarát. Ezután megvizsgáltuk a *ppr40-1* mutánsban a ROS esetleges felhalmozódást és az annak következtében megváltozott folyamatokat. H_2O_2 képződést mértünk, és gyökérből izolált mitokondriumoknál 20%, míg sejtszuspenzióból izolált mitokondriumoknál 30%-kal több H_2O_2 képződött a *ppr40-1*-ben, mint a vad típusban. A lipid peroxidáció mértéke 20-25%-kal volt nagyobb a *ppr40-1* mutánsban mint a vad növényben. A *ppr40-1* növényekben a H_2O_2 tartalom és lipid peroxidáció mértékének a megemelkedése azt mutatja, hogy az AOX-on keresztüli útvonal csak részben képes kompenzálni a hibát.

Stressz vagy specifikus gátlószerek hatására a III komplex működése sérül és szuperoxid gyökök képződnek róla. Megvizsgáltuk a *ppr40-1* mutáns SOD aktivitását levelekből tisztított enzimkivonatot használva, és 15%-kal nagyobb értéket kaptunk, mint a vad esetében. Amikor izolált mitokondriumból tisztított enzimkivonatot, és ezáltal csak a mitokondriális MnSOD aktivitását mértük, 40%-kal nagyobb aktivitást tapasztaltunk a *ppr40-1* mutánsnál, mint a vad esetében. Az megnövekedett mitokondriális MnSOD aktivitás is azt mutatta, hogy a *ppr40-1* mutánsban a mitokondrium a ROS képződés elsődleges helye. A sejtekben keletkező H_2O_2 többletet semlegesíthetik a katalázok vagy a H_2O_2 -dal más szubsztrátot oxidáló peroxidázok. Az aszkorbát peroxidázok (APX) az egyik legfontosabb antioxidánsok a növényekben. A *ppr40-1* mutánsban az APX aktivitása jelentősen, 35%-kal lecsökkent, ezáltal még sebezhetőbbé téve azt a ROS-kal szemben. Következtetésünket alátámasztotta az a megfigyelés, miszerint a *ppr40-1* mutáns jelentősen érzékenyebben reagált a ROS képző paraquat és a külsőleg hozzáadott H_2O_2 hatására. Mindkét esetben szignifikánsan nagyobb klorofill degradációt tapasztaltunk a kezelések hatására

a *ppr40-1* növényekben, míg kezelés nélkül a vad és *ppr40-1* klorofill tartalma megegyezett. Az eredményeink megerősítették azt az elképzelésünket, hogy a *ppr40-1* antioxidáns rendszerét elárasztják a mitokondriális elektrontranszport sérülése miatt keletkezett ROS, és a detoxifikációs mechanizmus ezért képtelen hatásosan csökkenteni a megemelkedett ROS szintet stresszhatás alatt. A *ppr40-1* mutáns fokozott stresszérzékenysége valószínűleg szintén egy válasz a megemelkedett ROS szintre.

Következtetések

A növényi a mitokondriumban lokalizálódó pentatrikopeptid repeat (PPR) doméneket tartalmazó fehérje, a PPR40 összekapcsolja a mitokondriális elektron transzportot a stresszválaszokkal és a hormonális szabályozással. A kis növésű *ppr40-1* mutáns fokozott só, ABS, cukor és ozmotikus stressz érzékenységet mutat, miközben a metilglioxál toxikus hatásával szemben ellenállóbbnak bizonyult, mint a vad típusú *Arabidopsis thaliana*. A teljes hosszúságú PPR40 cDNS túltermeltetése a *ppr40-1* mutáns növényekben helyreállította a megváltozott só és ABS érzékenységet és a csökkent méretet. A PPR40 fehérje a mitokondriumba lokalizálódik, és a mitokondriális légzési lánc III komplexéhez kapcsolódik. A *ppr40-1* mutánsban a III komplexen keresztüli elektronáramlás erősen lecsökkent, miközben a IV komplex működik, ami arra utal, hogy a PPR40 fehérje jelentős szerepet játszik a III komplex citokróm c redukáz aktivitásának fenntartásában. A *ppr40-1* mutáns fokozott stresszérzékenységéhez magasabb SOD aktivitás, reaktív oxigénformák felhalmozódása, felerősödött lipid peroxidáció és prolin felhalmozódás társul. Ezekon kívül néhány, a stresszválaszban szerepet játszó gén - az alternatív oxidáz *AOX1d* és az 1 és 2 glioxalázok fehérjéit kódoló gének - aktivitása megváltozik. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy szoros

kapcsolat van az oxidatív légzés és a környezeti alkalmazkodás között *Arabidopsisban*. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a PPR40 fehérje hiánya következtében sérülnek a mitokondrium elektrontranszport folyamatai, fokozódik a ROS képződés, és alternatív elektronszállítási útvonalak aktiválódnak. Tehát a PPR40 elengedhetetlenül szükséges a mitokondriális légzési lánc zavartalan működéséhez.

Az értekezés alapját képező publikációk

Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Ábrahám E, Kerekes I, **Zsigmond L**, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gál M, Berente A, Rédei GP, Haim AB, Koncz C (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* 32: 233-242

Zsigmond L (2004) Characterisation of the ABA sensitivity influencing *Arabidopsis* PPR gene. *Acta Biol Szeged* 48:93

Zsigmond L, Rigó G, Szarka A, Székely Gy, Ötvös K, Darula Zs, Medzihradszky KF, Koncz Cs, Koncz Zs, and Szabados L (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* (közlés alatt, Epub: 2008. február 27.)