

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A fenolos peroxidáz enzimek szerepe a növények ultraibolya sugárzáshoz történő alkalmazkodásában

Ph.D. értekezés tézisei

Rácz Arnold

Témavezető:

Dr. Hideg Éva

egyetemi tanár

PÉCS, 2021

1. Tudományos előzmények

A Föld felszínre érő UV sugárzás két tartományra osztható: az alacsonyabb hullámhosszúságú, így nagyobb energiájú UV-B (280-315 nm) és a kisebb energiájú UV-A (315-400 nm). A növények szinte minden életfolyamatára, a morfológiájától kezdve a biokémiai folyamatokig hatással van az UV-B, mely az UVR8 fotoreceptoron keresztül egy sor génexpressziós változást indíthat el (Brown és mtsai. 2005). A jelenlegi ismereteink szerint azonban nem minden UV-B válasz az UVR8 által szabályozott. Egyrészt feltételezik fotoreceptor független bioszintézis utak lehetőségét is (Jenkins 2017), másrészt a közelmúltban az UVR8-tól különböző UV-B fotoreceptor által szabályozott válaszok lehetősége is felmerült (O'Hara és mtsai. 2019).

A fotoreceptor független jelátviteli utak kutatása során felmerült a reaktív oxigén származékok (ROS) lehetséges szerepe, mivel az UV-B sugárzás más abiotikus stresszorokhoz hasonlóan antioxidáns válaszokat is okoz. Az UV sugárzásnak kitett növényeknek több szempontból is szükségük van egy hatékony a hidrogén-peroxid (H_2O_2) szint szabályozó rendszerre (Jansen és mtsai. 2001; Majer és mtsai. 2014; Czégény és mtsai. 2016a 2016b; Rác és mtsai. 2018; Czégény és mtsai. 2019). Más stresszválaszokhoz hasonlóan, ebben az esetben is szükséges egy olyan H_2O_2 koncentráció fenntartása, amely nem elég magas ahhoz, hogy károsító hatással legyen, de elegendő ahhoz, hogy hírvivő molekulaként működjön. A H_2O_2 szint növekedését más abiotikus stresszorokhoz hasonlóan az UV-B sugárzás is kiváltja, viszont a nagy energiájú UV-B fotonok közvetlen elnyelésével a H_2O_2 erősen oxidáló hatású hidroxil gyökké alakulhat át (Czégény és mtsai. 2014). Ennek megfelelően, míg más abiotikus stressz hatására az akklimatizáció során a H_2O_2 keltő szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a H_2O_2 semlegesítő peroxidázok aktivitásának párhuzamos növekedését tapasztalták, az UV-B válasz során az utóbbi válasz erősödése nagyobb mértékű volt (Czégény és mtsai. 2016). Ez az egyedi válasz a tanszékünkön végzett korábbi kutatások szerint az UV-B dózistól és modellnövény fajtól függően ez kétféle módon valósulhat meg: a H_2O_2 szintet emelő SOD aktivitáshoz képest nagyobb mértékű H_2O_2 semlegesítő hármastípusú peroxidáz (POD) aktivációval (Majer és mtsai. 2014, Czégény és mtsai. 2016a) vagy a POD aktivitás növekedéssel a SOD aktivitás változása nélkül (Czégény és mtsai. 2019). A H_2O_2 szint szöveti változását számos más abiotikus stressz mellett az UV-B sugárzás is kiváltja (Czégény és mtsai. 2014), amit a dolgozatban bemutatásra kerülő eredményeink is megerősítettek (Rác és mtsai. 2020). Az antioxidáns enzimek és ROS egyensúlyának UV-B hatására történő megváltozását Jansen és mtsai. (2008) és Hideg és mtsai. (2013) munkái foglalják össze. A természeteshez közeli dózisu,

a növények fotoszintetikus folyamatait nem károsító, alkalmazkodást kiváló UV kezelések esetén azonban a POD izoformák aktivitás változásait eddig még nem tanulmányozták.

Az UV sugárzás hatására megjelenő enzimatikus válaszokkal párhuzamosan a növényi speciális anyagcsereutak szabályozása is módosul. Egyik jelentős UV-B akklimációs válasz a levelekben a fenolos savak és flavonoidok mennyiségének megemelkedése (Schreiner és mtsai. 2012). Ezek a speciális metabolitok a UV-kezelt levelekben kiemelt fontosságú H_2O_2 mennyiségének szabályozásában közvetett módon, POD szubsztrátként vagy közvetlen ROS semlegesítő molekulaként is részt vehetnek. Ez utóbbi funkciójuk a növényi szövetekben annak alapján feltételezett, hogy számos fenolos vegyület mutat nagy reaktivitást a H_2O_2 -ra *in vitro* (Csepregi és Hideg 2018). Az UV-B hatására megnövekedett mennyiségben képződő polifenolos vegyületek POD szubsztrát tulajdonságairól azonban a PhD munka megkezdésekor még csak kevés ismeretünk volt.

Az UV-B által kiváltott génexpressziós válaszokat *Arabidopsis thaliana* növényekben vizsgálták meg, fotoreceptor hiányos mutánsok segítségével. Bár több, UVR8 fotoreceptoron keresztül indukálható gént azonosítottak, ezek között nem szerepeltek POD fehérjét kódoló (Velanis és mtsai. 2016). Dohány növényekben egyelőre nem állnak rendelkezésre UVR8 fotoreceptor mutánsok, a POD enzim válaszok génexpresszió szintű vizsgálata pedig az ezeket a fehérjéket kódoló géncsalád komplexitása miatt nehézkes. Ezért kísérleteink során az UV-B sugárzáshoz történő alkalmazkodást elősegítő folyamatokat az antioxidáns enzim aktivitások, nem enzimatikus antioxidáns kapacitások, levél H_2O_2 és fenolos vegyület tartalom alapján vizsgáltuk három szempont szerint:

- i. A szélessávú UV-B kezelés használatával újabb információkat szereztünk az UV-indukálható fenolos vegyületek alkalmazkodást elősegítő szerepéről és a POD antioxidáns válasz komplexitásáról.
- ii. Exogén H_2O_2 kezelés és az UV-B sugárzás hatásainak összehasonlítása alapján vizsgáltuk az UV-B hatására megemelkedő endogén H_2O_2 alkalmazkodási folyamatokban betöltött lehetséges szerepét.
- iii. A feltételezett UVR8 független fotoreceptort aktiváló, de az ismert UVR8 fotoreceptor abszorpciós maximumán kívül eső 311 nm sugárzást kibocsátó keskenysávú UV-B forrás által kiváltott alkalmazkodási válaszokat hasonlítottunk össze a szélessávú UV-B kezelésre adott válaszokkal.

2. Célkitűzések

A dolgozatomban bemutatott kutatásaink célja az volt, hogy megvizsgáljam a különböző H_2O_2 semlegesítő utak, különösen a hármas típusú peroxidáz enzimek (POD) hozzájárulását a levelek UV-B toleranciájához.

A vizsgálatokhoz először metodikai összehasonlításokat végeztünk, új, és hatékonyabb mérési módszereket keresve a következők alapján:

1. Hogyan befolyásolja a levelek kora az UV-B-indukált POD válaszokat?
2. Korábban már megállapításra került, hogy az UV-B válasz egy kulcsfontosságú része a POD aktivitásának emelkedése. A leggyakrabban használt enzimaktivitásmérő esszék közül melyik a legalkalmasabb a POD válasz általános jellemzésére?
3. Mutatnak szubsztrát preferenciát az UV-B kezelés által befolyásolt POD válaszok?

A levelekben UV-B-indukált fenolos vegyületek szerepének vizsgálatához kapcsolódóan megvizsgáltuk:

4. Milyen fenolos szubsztrátokat preferálnak az UV-B kezelés hatására megemelkedő aktivitást mutató POD formák?
5. Azonosak ezek a fenolos vegyületek azokkal, amelyek mennyisége növekszik az UV-B kezelt növényekben?
6. A POD szubsztrát funkció mellett milyen más szerepben járulhatnak hozzá az UV-B-indukálta fenolos vegyületek az alkalmazkodáshoz?

Az UV-B válaszok eredetét, a UVR8 fotoreceptor esetleges részvételét a következő indirekt módon vizsgáltuk meg az alábbi kérdések alapján:

7. Milyen azonosságok és különbségek találhatóak a levelek H_2O_2 tartalmát megemelő UV-B megvilágítás, és a hasonló hatású, exogén H_2O_2 oldattal történő kezelésre adott antioxidánsok válaszok között?
8. Kiválthatók a szélessávú UV-B megvilágításra adott alkalmazkodási válaszok az UVR8 fotoreceptor jelenleg elfogadott abszorpciós tartományán kívül eső keskenysávú 311 nm UV-B kezelés alkalmazásával is?

3. Anyagok és módszerek

A dolgozat kísérleteihez a dohánynövények (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 és Xanthi) a vetéstől a kísérletek végéig általános virágföldben nőttek, növénynevelő kamrákban, 65% páratartalom és hosszúnappalos (16 órás napi megvilágítás) körülmények mellett, $110\text{--}150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotoszintetikusan aktív sugárzást (PAR) használva. A kísérletekhez 4-5 hetes, UV mentes körülmények között nevelt növényeket használtunk. A kiegészítő UV kezelést minden esetben a fényperiódus közepén alkalmaztuk napi 4-5 órán keresztül. A szélessávú, 280-315 nm UV-B kezelések biológiailag hatékony UV-B napi dózisa $6.9\text{--}7.7 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ között volt (Flint és Caldwell 2003 alapján számítva). Egy másik kísérletsorozatban a keskenysávú, kvázi-monokromatikus 311 nm kibocsátású fénycsövet a növénynevelő kamrában ferdén leeresztve helyeztünk el, ezzel biztosítva, hogy az alatta elhelyezett növények mindegyikét különböző UV-B dózis érje azonos PAR háttér mellett, aszerint, hogy milyen távolságban (5 – 52 cm) voltak az UV forrástól. Ebben kísérletsorozatban a növényeket érő UV-B $4.6\text{--}16 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ biológiailag hatékony UV-B napi dózisoknak feleltek meg. A hidrogén peroxid közvetlen hatásait vizsgáló kísérletekben a növényeket 100 mL 100 μM H_2O_2 -al oldattal locsoltuk (kontroll növényeket 100 mL vízzel).

A növények fotokémiai paramétereinek vizsgálatához klorofill fluoreszcencia méréseket végeztük Imaging-PAM műszerrel. A levelek noninvazív klorofill és flavonoid tartalom mérését Dualex® Scientific készülékkel végeztük. A levélmintákat ezután a további elemzésekig mélyfagyasztva tároltuk.

A levélkivonatok elkészítése után elvégeztük a minták hármastípusú peroxidáz enzim (POD), aszkorbát peroxidáz (APX), glutation peroxidáz (GPX), kataláz (CAT), és szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitásának spektrofotometriás vizsgálatát. A levélminták H_2O_2 tartalmának fotometriás megbecslését Mátai és Hideg (2017) alapján végeztük el. A 70% etanolt tartalmazó levélkivonatok nem enzimikus H_2O_2 és szuperoxid gyök $\text{O}_2^{\cdot-}$ semlegesítő antioxidáns kapacitás meghatározását Csepregi és Hideg (2016) alapján végeztük el. A peroxidáz izoformák elválasztásához a mintákat natív 12% Tris-Glicin gélen szeparáltuk.

4. Új tudományos eredmények

A növényi POD aktivitást mérő különböző módszerek metodikai összehasonlításai alapján a következőket állapítottuk meg:

1. A különböző korú, teljesen kifejlett és még nem szenescens dohánylevelek UV-B-indukálta POD aktivitás növekedése különböző mértékű, ami egy nádusz távolságban is detektálhatóak. Ennek alapján az UV-B hatások vizsgálata során nem javasoljuk növényenként egynél több levél összevonását egy mintaelemmé, sem pedig különböző korú levelek használatát a különböző minták összehasonlításában (Rácz és mtsai. 2018).
2. A szakirodalom alapján leggyakrabban használt kromofórok közül az ABTS bizonyult a legalkalmasabb mesterséges szubsztrátnak a POD általános jellemzésére dohány növényekben, mert ezzel mérhető a legmagasabb aktivitás. Az ismert eljárások kiterjesztéseként alkalmaztunk a dohánylevelekben megtalálható polifenolos vegyületeket is POD szubsztrátként, és megmutattuk az UV indukálta POD válasz heterogenitását. A szubsztrát preferenciák összehasonlítás alapján pedig azt találtuk, hogy az UV-alkalmazkodási válaszok vizsgálata során az enzim aktivitását klorogénsav (CGA) használatával (CGA-POD) érdemes detektálni (Rácz és mtsai. 2020).

A dohánylevelekben UV-B-indukált polifenolos vegyületek és fenolos peroxidázok vizsgálata (Rácz és mtsai. 2020) alapján elmondható, hogy:

3. Az UV-B kezeléshez alkalmazkodott, megtartott fotokémiai hatékonyságú növényekben a CGA és a quercetin-rutinozid (RUT) mennyisége növekedett a legnagyobb mértékben. Ez a két vegyület azonban különböző módon támogatja az UV-B-hez történő alkalmazkodást.
4. Az UV-B-vel kezelt levelekben a megnövekedett CGA-POD aktivitás magyarázata a megemelkedett CGA tartalom mellett az lehet, hogy a többi, direkt antioxidánsként vagy POD szubsztrátként hatékony más fenolos vegyülethez képest az oxidált CGA regenerációja a leghatékonyabb.
5. Az UV kezelés hatására megemelkedő RUT mennyiség nem járt együtt a RUT-POD aktivitás megemelkedésével. A RUT nem POD szubsztrátként, hanem direkt H_2O_2 semlegesítő antioxidánsként járul hozzá az alkalmazkodás folyamatához.

Az UV-B válaszok eredetét célzó, esetleges UVR8 fotoreceptor nélkül kialakuló válaszok vizsgálata során a következő megállapításokat tehetjük:

6. Az UV-B kezelés egyik hatása a levelekben megemelkedő H_2O_2 koncentráció, ami azonban UV-B megvilágítás nélkül, exogén H_2O_2 kezeléssel is elérhető. A H_2O_2 kezelés hatására kialakult antioxidáns válaszok azonban eltérő képet mutattak az UV-B kezeléshez képest. Az UV-B hatására elsősorban az enzimatikus védelmi utak aktiválódtak, és a kezeletlenekhez képest csökkent szuperoxid-dizmutáz (SOD) és emelkedett fenolos POD aktivitás jellemezte a leveleket. A H_2O_2 kezelés hatására viszont nem ezek a védelmi utak, hanem a nem-enzimatikus antioxidáns kapacitás nőtt meg, amihez a fenolos vegyületek hozzájárulása feltehetően csekély. Ez az különbség azt mutatja, hogy a H_2O_2 nem, vagy csak kis mértékben vesz részt másodlagos jelként az UV-B indukált válaszokban (Rácz és mtsai. 2020).
7. Az ismert UVR8 fotoreceptor jelenleg elfogadott abszorpciós tartományán kívül eső keskenysávú (311 nm) UV-B alkalmazásával a szélessávú UV-B hatásához képest ellentétes irányú antioxidáns enzim válaszokat kaptunk. A 311 nm UV-B hatására a levelekben a kezeletlenekhez képest csökkent a CGA-POD és emelkedett a SOD aktivitása. Az UV-B dózissal egyenes arányban bekövetkező változások mellett csak nagy dózisu 311 nm kezelés esetén jelent meg a levelek H_2O_2 szintjét csökkentő nem enzimatikus antioxidáns kapacitások emelkedése. A megfigyelt különbség további kísérletekkel releváns lehet az irodalomban nemrég felvetődött, UVR8-tól különböző, feltételezetten 310-311 nm sugárzással aktiválható fotoreceptorral kapcsolatos kutatásokban; de jelezhet más, fotoreceptor független UV-B válaszutakat is. Ez az eredményünk rámutatott arra is, hogy az egyes UV-B hullámhosszak, keskeny hullámhossz tartományok elkülönített vizsgálata is fontos lehet a természetben bekövetkező komplex UV-B válasz megértésében (Rácz és Hideg 2021).

5. Irodalomjegyzék

- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J., Jenkins, G.I. (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 18225-18230.
- Czégény, Gy., Wu, M., Dér, A., Eriksson, L.A., Strid, Å., Hideg, É. (2014) Hydrogen peroxide contributes to the ultraviolet-B (280–315nm) induced oxidative stress of plant leaves through multiple pathways. *FEBS Lett.* 588: 2255-2261.
- Czégény, Gy., Le Martret, B., Pávkovics, D., Dix, P.J., Hideg, É. (2016a) Elevated ROS-scavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. *J. Plant Physiol.* 201: 95-100.
- Czégény, Gy., Máta, A., Hideg, É. (2016b) UV-B effects on leaves – oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* 248: 57-63.
- Czégény, G., Kőrösi, L., Strid, Å., Hideg, É. (2019) Multiple roles for Vitamin B6 in plant acclimation to UV-B. *Sci. Rep.* 9, 1259.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2016) A novel procedure to assess the non-enzymatic hydrogen-peroxide antioxidant capacity of metabolites with high UV absorption. *Acta Biol. Hung.* 67: 447-450.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2018) Phenolic compound diversity explored in the context of photo-oxidative stress protection. *Phytochem. Anal.* 29: 129-136.
- Flint, S.D., Caldwell, M.M., (2003) A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiol. Plant.* 117: 137-144.
- Hideg, É., Jansen, M.A.K., Strid, Å. (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18: 107-115.
- Jansen, M.A.K., van den Noort, R.E., Tan, M.Y.A., Prinsen, E., Lagrimini, L.M., Thorneley, R.N.F. (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* 126: 1012-1023.
- Jansen, M.A.K., Hectors, K., O'Brien, N.M., Guisez, Y., Potters, G. (2008) Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175: 449-458.
- Jenkins, G.I. (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 60: 407-431.
- Jenkins, G.I. (2017) Photomorphogenic responses to ultraviolet-B light. *Plant Cell Environ.* 40: 2544-2557.
- Majer, P., Czégény, Gy., Sándor, Gy., Dix, P.J., Hideg, É. (2014) Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. *Plant Physiol. Biochem.* 82: 239-243.
- O'Hara, A., Headland, L.R., Díaz-Ramos, L.A., Morales, L.O., Strid, Å., Jenkins, G.I. (2019) Regulation of *Arabidopsis* gene expression by low fluence rate UV-B independently of UVR8 and stress signaling. *Photochem. Photobiol. Sci.* 18: 1675-1684.
- Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (2018) Selective responses of class III plant peroxidase isoforms to environmentally relevant UV-B doses. *J. Plant Physiol.* 221: 101-106.

Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (2020) Ultraviolet-B acclimation is supported by functionally heterogeneous phenolic peroxidases. *Sci. Rep.*10:16303.

Rácz, A., Hideg, É. (2021) Narrow-band 311 nm ultraviolet-B radiation evokes different antioxidant responses from broad-band ultraviolet. *Plants* 10: 1570.

Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M.A.K., Zrenner, R., Winkler, J.B., O'Brien, N., Krumbein, A. (2012) UV-B-induced secondary plant metabolites – potential benefits for plant and human health. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 229-240.

Velanis, Ch.N., Herzyk, P. & Jenkins, G.I. (2016) Regulation of transcription by the *Arabidopsis* UVR8 photoreceptor involves a specific histone modification. *Plant Mol. Biol.* 92: 425-443.

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk

Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (2018) Selective responses of class III plant peroxidase isoforms to environmentally relevant UV-B doses. *J. Plant Physiol.* 221: 101-106.

Q1, IF₂₀₁₈ = 2.825

Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (2020) Ultraviolet-B acclimation is supported by functionally heterogeneous phenolic peroxidases. *Sci. Rep.*10:16303.

D1, IF₂₀₂₀ = 3.998

Rácz, A., Hideg, É. (2021) Narrow-band 311 nm ultraviolet-B radiation evokes different antioxidant responses from broad-band ultraviolet. *Plants* 10: 1570.

Q1, IF₂₀₂₀ = 3.935

A dolgozat témájához nem kapcsolódó publikációk

Csepregi, K., Teszlák, P., **Rácz, A.,** Czégény, Gy., Kőrösi, L., Hideg, É. (2021) Changes in grapevine berry skin photochemistry may support metabolic responses to postharvest treatment by ultraviolet light. *Photosynthetica* 59: 286-293.

Q1, IF₂₀₂₀ = 2.562

Konferenciakivonatok

Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (April, 2018) Exogenous hydrogen peroxide affects leaf UV-B responses. 2nd Network Meeting of UV4Plants, Bled, Slovenia. ISBN: 978-961-6822-48-0

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É (June, 2018) The role of hydrogen peroxide and its detoxification in acclimation to supplemental UV-B. Plant Biology Europe 2018 Conference, Copenhagen, Denmark. ISBN: 978-879-9627-41-7

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É (April, 2019) Plants's little helper, the effects of hydrogen peroxid pre-treatment. UV-B and Climate Change; impacts on plants and vegetation. UV4Plants Workshop, Cork, Ireland.

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É. (August, 2019) Leaf antioxidant responses to exogenous and photobiologically generated endogenous hydrogen peroxide. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Hideg, É., Czégény, Gy., Csepregi, K., **Rácz, A.** (August, 2019) Taking sides in the battle of pro-and antioxidants: Diverse roles of phenolic compounds in stressed plants. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Csepregi, K., Czégény, Gy., **Rácz, A.,** Hideg, É. (August, 2019) Improving the stress tolerance of pepper seedlings via manipulating secondary metabolites with UV irradiation. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (April, 2020) New aspects of leaf phenolic responses to UV. 3rd Network Meeting of UV4Plants, Kiel, Germany.

Rácz, A., Hideg, É. (August 2021) A széles és a keskeny sávú (311 nm) ultraibolya-B sugárzás eltérő antioxidáns védelmi utakat aktivál modellnövényekben. 13th Hungarian Congress of Plant Biology, Szeged, Hungary.

Rácz, A., Hideg, É. (September 2021) Broad and narrow band (311 nm) ultraviolet-B radiation activates distinct defensive antioxidant pathways. 19th Congress of the European Society for Photobiology, Salzburg, Austria. ISBN 978-3-200-07802-4