

Sejthalál a növényvédelemben: az élelmiszer-ellátás biztonságának növelése molekuláris biológiai módszerekkel

Kulcsszavak: programozott sejthalál, harpin fehérjék, akrolein, ferroptózis-szerű sejthalál, hőstressz

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A mezőgazdaság fontos feladata a növények védelme a patogének által kiváltott biotikus és a környezeti hatások által kiváltott abiotikus stresszel szemben. A patogénekkal szembeni védekezés hagyományosan kémiai növényvédő szerekkel történik, amelyek károsíthatják a környezetet és az egészségünket, így komoly igény merül fel arra, hogy ezeket környezetbarát anyagokra cseréljük. Ígéretes biopeszticidek lehetnek a kutatócsoportunk által is tanulmányozott elicitor hatású harpin fehérjék. Ezek a fehérjék valódi patogénfertőzés nélkül váltanak ki immunválaszt a növényekben, ezzel fokozva az ellenállóképességüket, valamint egyéb előnyös hatásait is leírták már, úgy, mint az intenzívebb növekedés vagy a nagyobb terméshozam. Ezen fehérjék egyelőre nem teljesen tisztázott hatásmechanizmusainak jobb megértése segítheti a hatékonyabb biopeszticidek fejlesztését. A Föld átlaghőmérsékletének emelkedésével egyre nagyobb szerep juthat a hőstressz hatására beinduló ferroptózis-szerű sejthalálnak is. Ennek az először 2017-ben leírt sejthalál folyamatnak a pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert, azonban eredményeink arra utalnak, hogy a reaktív karbonilvegyületek – köztük az akrolein – mediátor szerepet játszhatnak benne. A ferroptózis-szerű sejthalál irodalmi adatok alapján a patogéntámadás hatására bekövetkező hiperszenzitív sejthalálban is szerepet játszik, így a sejthalál folyamat jobb megértése egyszerre segítheti a biotikus és az abiotikus stresszel szembeni védekezést.

¹ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2. Bevezetés

A növények védelme a patogének által kiváltott biotikus és a kedvezőtlen környezeti hatások által kiváltott abiotikus stresszel szemben fontos, és egyre nagyobb kihívást jelent a mezőgazdaság számára. Ezért fontossá vált, hogy a molekuláris biológia eszköztárát is felhasználva jobban megismerjük a növények és a növényi sejtek biokémiáját, ezzel elősegítve új, hatékonyabb védekezési módok kidolgozását, és a növények stressztűrő képességének fokozását, ezzel növelve az élelmiszer-ellátás biztonságát.

3. Harpinek a növényvédelemben

Problémát jelent, hogy a biotikus stresszel szemben jelenleg főleg kémiai növényvédő szerekkel védekezünk, amelyek egy része hosszútávú és súlyos környezeti hatásokat okozhat. Ezért több törekvés irányul arra, hogy ezeket környezetbarát biopesticidekre cseréljük. A biopesticidek fejlesztésének egyik ígéretes vonala lehet az elicitor (aktivációs szignál) hatású harpin fehérjék alkalmazása. A harpinek olyan savas, hőstabil, cisztein szegény, de glicinben és leucinban gazdag fehérjék, amelyeket a III-as típusú szekréciós rendszerrel rendelkező baktériumok, mint pl. a *Pseudomonas syringae* és az *Erwinia amylovora* termelnek [1, 2, 3]. A termelő törzsből kinyert, tisztított harpin fehérjék kis koncentrációban alkalmazva (~100 nM), vagy a növényi sejtekben expresszáva fokozzák az immunválasz-gének expresszióját, amelyek hatására a növény ellenállóbbá válik a patogénekkal szemben. Ezen felül a harpinekkel kezelt növényekben további előnyös hatásokat figyeltek meg, úgy mint a nagyobb termés hozam és az intenzívebb növekedés [4].

A harpinek jótékony hatásainak pontos oka jelenleg még nem ismert, azonban kutatócsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy *Arabidopsis thaliana* szuszpenziós sejt kultúrákban harpin kezeléssel biotikus stressz váltható ki. Ennek során úgynevezett oxidatív kitörés következik be a sejtekben, amely a reaktív oxigénvegyületek (ROS) mennyiségének ugrásszerű és jelentős megnövekedésével jár, és ennek hatására indukálódik az antioxidáns rendszerük. Eredményeink alapján az aszkorbinsav bioszintézisének sebességmeghatározó lépését katalizáló VTC2 és 5 enzimek expressziója, valamint a bioszintézis utolsó lépését katalizáló L-galaktono-1,4-lakton-dehidrogenáz (GLDH) enzim expressziója és aktivitása megnő, és –feltehetően az előzőek miatt– a sejtek aszkorbinsav tartalma is fokozódik. Kimutattuk továbbá, hogy a növényi antioxidáns-rendszer központi elemét képező aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek aktivitása is fokozódik [5]. Ezek alapján tehát a harpin fehérjékkel valódi patogén fertőzés nélkül váltható ki biotikus stressz a növényekben, amely –többek között– indukálja a növényi antioxidáns rendszert, ezzel fokozva a valódi patogénekkal szembeni ellenállóképességet.

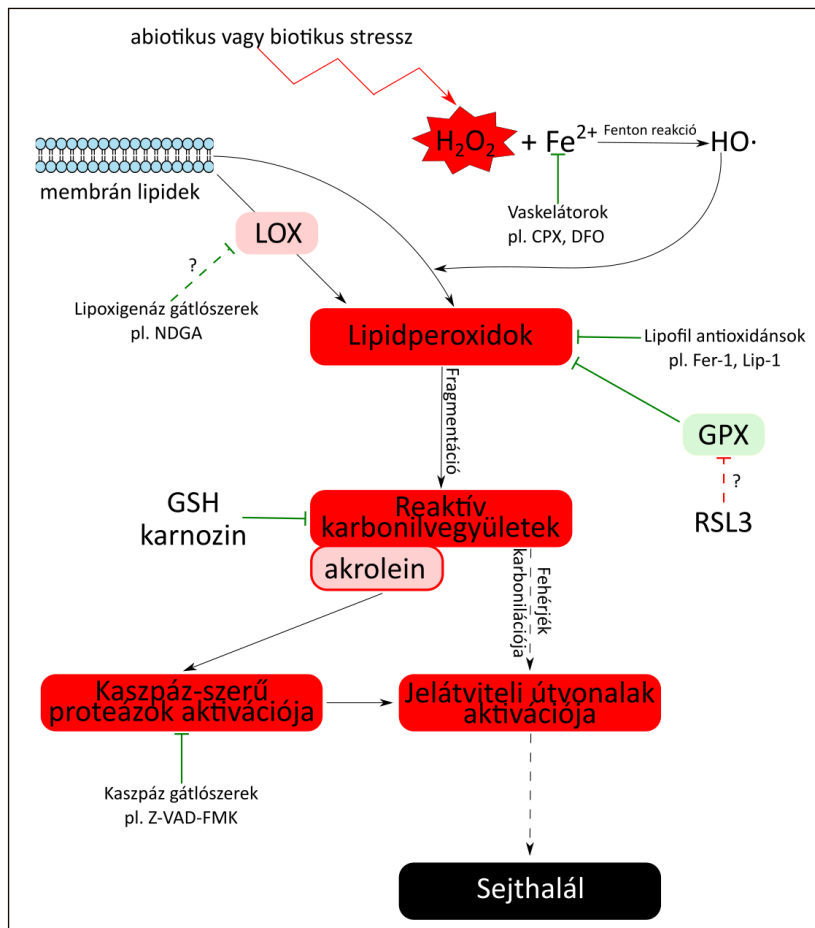
4. A ferroptózis-szerű sejthalál

A harpinek magasabb (>250 nM) koncentrációban ún. hiperszenzitív sejthalált váltanak ki a kezelt növényekben [3–5]. Hiperszenzitív sejthalál a természetben akkor következik be, amikor egy növény rezisztens az adott patogénre (inkompatibilis interakció). Ilyenkor a növényi immunrendszer felismeri a patogént, és gyorsan, programozott módon elpusztítja a saját megtámadott sejtjeit annak érdekében, hogy a növény egészét megvédje. 2019-ben Dangol és munkatársai leírták, hogy a rizs (*Oryza sativa*) és *Magnaporthe oryzae* gomba inkompatibilis reakciója során bekövetkező hiperszenzitív sejthalálra lipidperoxidáció, valamint a ROS és vas(III)-ionok akkumulációja jellemző. A vaskelátor deferroxaminnal és a lipofil antioxidáns ferrostatin-1-gyel kezelve a sejteket azonban megakadályozható volt a vasfüggő ROS akkumuláció és a lipidperoxidáció, amely a hiperszenzitív reakció teljes megszüntetéséhez vezetett. Ezek alapján Dangol és munkatársai azt feltételezik, hogy az inkompatibilis növény-patogén interakció során szerepet játszik ún. ferroptózis-szerű sejthalál is [6].

A ferroptózis emlőssejtek vasfüggő, kaszpáz-független programozott sejthalálformája, amelyet először 2012-ben írtak le [7]. A ferroptózis egyedi, a többi sejthalálformától eltérő morfológiai és biokémiai markerekkel bír, továbbá specifikus induktorait (pl. erastin és RSL3), valamint gátlószereit (pl. ferrostatin-1) is azonosították már. A sejthalál folyamat a celluláris glutation erastin általi depleciójával, vagy a lipidperoxidok eliminációjában kulcsszerepet játszó glutation peroxidáz 4 (GPX4) enzim gátlásával váltható ki. A beinduló folyamatra – az indukció módjától függetlenül – fokozott ROS termelés, nagyfokú lipidperoxidáció és az intracelluláris szabad vas megemelkedése jellemző. Ezen tulajdonságainak köszönhetően a ferroptózis folyamata lipofil antioxidánsokkal (pl.: ferrostatin-1, liproxstatin-1, α -tokoferol) és vaskelátorokkal (pl.: deferroxamin) is felfüggeszthető [8].

Distéfano és munkatársai 2017-ben egy, a ferroptózishoz nagyon hasonló sejthalál folyamatot írtak le a növényeken [9]. A kutatók 10 percig tartó 55 °C-os hőkezelésnek vetették alá *Arabidopsis thaliana* gyökérszőrőket, és azt találták, hogy a hőkezelés hatására sejtpusztulás következik be, valamint a glutation-szint csökkenését és a mitokondriumok zsugorodását figyelték meg, amely a ferroptózis egyedi morfológiai markere emlőssejtekben. A szerzők azt is kimutatták, hogy a hőstressz által kiváltott sejthalál mértéke a ferroptózis gátlószer ferrostatin-1-gyel vagy ciklopirox olaminnal (vaskelátor) előkezelt gyökérszőrök esetében szignifikánsan csökkent.

Ugyanezen inhibitoroknak azonban nem volt hatása erősebb, 77 °C-os hőstressz, H₂O₂ kezelés vagy sóstressz esetén. Nem volt hatása az inhibitoroknak a vaszkuláris differenciáció és a fejlődés során bekövetkező további programozott sejthalál folyamatokra sem. Ezek alapján arra következtetnek a szerzők, hogy a közepes mértékű hőstressz által kiváltott sejthalál egyedi folyamat a növényekben, és a ferroptózishoz mutatott nagyfokú hasonlósága alapján ferroptózis-szerű sejthalálnak nevezték el azt. Fontos azonban kiemelni, hogy a ferroptózis-szerű sejthalál, szemben az emlőssejtek kaspáz-független ferroptózisával, minden jel szerint egy kaspáz-szerű proteázfüggő folyamat (**1. ábra**) [9, 10, 11].



1. ábra. A ferroptózis-szerű sejthalál feltételezett mechanizmusa.

Az **1. ábrán** látható, hogy a ferroptózis-szerű sejthalál fontos eleme a nagymértékű lipidperoxidáció, amely bekövetkezhet lipoxigenáz (LOX) enzimek által katalizált módon, vagy nem enzimes módon. A nem enzimes lipidperoxidációért a nagyreaktivitású hidroxilgyök (HO•) felelős, amely a biotikus vagy abiotikus stressz hatására keletkező hidrogén-peroxid (H₂O₂) és az intracelluláris szabad vas reakciójából (Fenton reakció) keletkezik. Az említett tulajdonságok miatt a ferroptózis-szerű sejthalál felfüggeszthető vaskelátorokkal (pl. ciklopirox olamin (CPX); deferoxamin (DFO)), lipofil antioxidánsokkal (pl. liproxstatin-1 (Lip-1); ferrostatin-1 (fer-1)), valamint lehetséges, hogy lipoxigenáz gátlószerekkel (pl. nordihidro-gvajarénsav (NDGA)) is. Ferroptózis-szerű sejthalál kiváltható még a – fiziológias körülmények között is termelődő – lipidperoxidok eliminációjában szerepet játszó, feltehetően glutation peroxidáz enzimek RSL3 általi gátlásával is. A sejthalál lipidperoxidációt követő mechanizmusa még nem ismert, lehetséges azonban, hogy a lipidperoxidok fragmentációja révén keletkező reaktív karbonilvegyületek mediátor szereppel bírnak a sejthalál folyamatban a fehérjék karbonilációja, ezáltal funkciójuk megváltoztatása révén. Az egyik ilyen reaktív karbonilvegyület az akrolein, amelyről ismert, hogy a növényi programozott sejthalál folyamatokban szerepet játszó kaspáz-szerű proteázok aktivátora.

A ferroptózis és a ferroptózis-szerű sejthalál lipidperoxidációt követő pontos molekuláris mechanizmusa jelenleg még nem ismert. Ismert azonban, hogy a lipidperoxidok fragmentációja révén reaktív karbonilvegyületek keletkeznek, és lehetséges, hogy ezek részt vesznek a sejthalál kiváltásában a fehérjék karbonilálása és ezáltal funkciójuk megváltoztatása révén. Az egyik ilyen reaktív karbonilvegyület az akrolein, amely BY-2 dohánysejtekben glutation (GSH) depléciót és ROS termelést indukál, aktiválja a kaspáz-3-szerű proteázokat, majd végül sejthalált okoz [12]. Ezek az eredmények nagyban hasonlítanak a hőkezelés hatására bekövetkező ferroptózis-szerű sejthalál során megfigyeltekhez, így kutatócsoportunkban felmerült, hogy az akrolein mediátor szereppel bírhat a ferroptózis-szerű sejthalálban.

Munkánk során akroleinnel és az ismert ferroptózis induktor RLS3-mal kezeltünk *Arabidopsis thaliana* szuszpenziós sejtkultúrákat, ferroptózis gátlószerek jelenlétében és azok hiányában is [10]. Eredményeink azt mutatják, hogy az akrolein által kiváltott sejthalál szignifikáns mértékben csökkenthető az olyan ismert ferroptózis gátlószerekkel előkezelve a sejteket, mint a ferrostatin-1, a deferoxamin, az α -tokoferol, vagy a GSH. A ferroptózis induktor RLS3-mal kezelve az *Arabidopsis* sejteket hasonló inhibitor profilt kaptunk, mint az akrolein esetében, valamint a reaktív karbonilvegyület kötő dipeptid, a karnozin mind az akrolein, mind az RLS3 által kiváltott citotoxicitást szignifikánsan csökkenteni tudta. Mindezekből arra következtethetünk, hogy az akrolein által kiváltott sejthalál legalább részben a ferroptózis-szerű útvonalon történik. Az általános kaszpázinhibitor, a Z-VAD-FMK alkalmazásával pedig kimutattuk, hogy a ferroptózis-szerű sejthalárhoz a kaszpáz-szerű proteázok aktivitására is szükség van, amely fontos különbség az emlőssejtek kaszpázfüggetlen ferroptózisához képest (1. ábra).

5. Kitekintés

A Föld átlaghőmérsékletének emelkedésével feltehetőleg egyre nagyobb szerepet fog játszani a növények életében a hőstressz és a hőstressz hatására beinduló ferroptózis-szerű sejthalál. Ennek a sejthalál folyamatnak a tanulmányozásával és jobb megértésével lehetőségünk nyílna az azzal szembeni célzott védekezésre és így haszonnövényeink hőstressz-tűrő képességének növelésére.

Felmerülhet a kérdés, hogy a termotoleráns, sivatagi növények miképpen védekeznek a ferroptózis-szerű sejthalál ellen. Az USA és Mexikó sivatagjaiban élő kreozot bokor (*Larrea tridentata*) levelei például nagymennyiségű nordihidro-gvajarétsavat (NDGA) tartalmaznak, amely egy általános lipoxigenáz gátló hatású lignán. A ferroptózisról már korábban leírásra került, hogy a lipoxigenázok fontos szerepet játszanak a sejthalál folyamatban a lipidperoxidáció enzim katalízise révén, így a lipoxigenáz inhibitoroktól ferroptózis-gátló hatás várható. Emlőssejteken már igazolták is az NDGA ferroptózis-gátló hatását, növényeken azonban még nem végeztek ilyen irányú kísérleteket [13,14].

Ahogy azt fentebb említettük, a ferroptózis-szerű sejthalálnak szerepe van a patogén támadás esetén beinduló hyperszenzitív reakcióban is, így a ferroptózis-szerű sejthalál jobb megértése a hatékonyabb biopeszticidek fejlesztése szempontjából is kiemelt fontosságú lehet, így kutatásunk egyszerre segítheti az abiotikus és a biotikus stresszel szembeni védekezést is.

6. Köszönetnyilvánítás

A szerzők munkáját a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K 123752, 2018-1.2.1-NKP-2018-00005, RRF-2.3.1-21-2022-00015, és TKP2021-EGA-02. azonosítószámú pályázatai támogatták.

7. Irodalom

- [1] Livaja, M.; Zeidler, D.; von Rad, U.; Durner, J. (2008) Transcriptional Responses of *Arabidopsis Thaliana* to the Bacteria-Derived PAMPs Harpin and Lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**, (3–4), 161–171, doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.10.004>
- [2] Livaja, M.; Palmieri, M.C.; von Rad, U.; Durner, J. (2008) The Effect of the Bacterial Effector Protein Harpin on Transcriptional Profile and Mitochondrial Proteins of *Arabidopsis Thaliana*. *J. Proteomics* **71**, (2), 148–159, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.04.002>
- [3] Chuang, H. wen; Chang, P.Y.; Syu, Y. yu (2014) Harpin Protein, an Elicitor of Disease Resistance, Acts as a Growth Promoter in *Phalaenopsis* Orchids. *J. Plant Growth Regul.* **33**, (4), 788–797, doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9425-1>
- [4] Choi, M.-S.; Kim, W.; Lee, C.; Oh, C.-S. (2013) Harpins, Multifunctional Proteins Secreted by Gram-Negative Plant-Pathogenic Bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**, (10), 1115–1122, doi: <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0050-CR>
- [5] Czobor, Á.; Hajdinák, P.; Szarka, A. (2017) Rapid Ascorbate Response to Bacterial Elicitor Treatment in *Arabidopsis Thaliana* Cells. *Acta Physiol. Plant.* **39**, (2), 62, doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2365-1>
- [6] Dangol, S.; Chen, Y.; Hwang, B.K.; Jwa, N. (2019) Iron- and Reactive Oxygen Species-Dependent Ferroptotic Cell Death in Rice- Magnaporthe Oryzae Interactions. *Plant Cell* **31**, (1), 189–209, doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00535>
- [7] Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; et al. (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **149**, (5), 1060–1072, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

- [8] Hirschhorn, T.; Stockwell, B.R. (2019) The Development of the Concept of Ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 130–143, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043>
- [9] Distéfano, A.M.; Martin, M.V.; Córdoba, J.P.; Bellido, A.M.; D'Ippólito, S.; Colman, S.L.; Soto, D.; Roldán, J.A.; Bartoli, C.G.; Zabaleta, E.J.; et al. (2017) Heat Stress Induces Ferroptosis-like Cell Death in Plants. *J. Cell Biol.* **216**, (2), 463–476, doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201605110>
- [10] Hajdinák, P.; Czobor, Á.; Szarka, A. (2019) The Potential Role of Acrolein in Plant Ferroptosis-like Cell Death. *PLoS One* **14**, (12), e0227278, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227278>
- [11] Distéfano, A.M.; López, G.A.; Bauer, V.; Zabaleta, E.; Pagnussat, G.C. (2022) Ferroptosis in Plants: Regulation of Lipid Peroxidation and Redox Status. *Biochem. J.* **479**, 857–866.
- [12] Biswas, M.S.; Mano, J. (2016) Reactive Carbonyl Species Activate Caspase-3-like Protease to Initiate Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell Physiol.* **57**, (7), 1432–1442, doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw053>
- [13] Probst, L.; Dächert, J.; Schenk, B.; Fulda, S. (2017) Lipoygenase Inhibitors Protect Acute Lymphoblastic Leukemia Cells from Ferroptotic Cell Death. *Biochem. Pharmacol.* **140**, 41–52, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.112>.
- [14] Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. (2018) Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, (3), 486–541, doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.