

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék

XXXI. OTDK Biológia Szekció

***Arabidopsis thaliana* glutation peroxidáz mutáns növények
ozmotikus stressz toleranciájának vizsgálata**



Bela Krisztina
Biológus MSc nappali szakos hallgató

Témavezető: Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar –
Növénybiológiai Tanszék

Szeged
2012

1. Tartalmi összefoglaló

Az élőlényeket, köztük a növényeket, egész életük során különböző környezeti hatások érik. Ezek egy részének extrém változása káros lehet számukra, stresszorként jelentkezik, stresszt vált ki a növényi szervezetekben. Az optimálistól eltérő életkörülményekhez a növények alkalmazkodni kényszerülnek, védekeznek a káros hatások ellen, megváltoztatják anyagcsere folyamataikat, jelátviteli és génexpressziós változások következnek be. A stressz elleni védelem fontos résztvevői az antioxidánsok, melyeknek enzimatiskelemei közé tartozik a glutation peroxidáz is.

A növényi glutation peroxidázok (GPX) a H_2O_2 és szerves hidroperoxidok eliminálásában vesznek részt tioredoxin, mint redukáló komponens felhasználásával. Az ebbe a családba tartozó *Arabidopsis thaliana* AtGPX2 és AtGPX3 fehérjék szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Kísérleteink során olyan *Arabidopsis* inszerciós mutánsokat használtunk, melyekben az AtGPX2 vagy AtGPX3 kifejeződése csökkent. Vizsgáltuk a mutáns növények növekedését, a keletkező H_2O_2 és lipidperoxidációs melléktermékek mennyiségét 50-300 mOsm mannitollal és polietilén glikollal (PEG) előidézett ozmotikus stressz valamint 25-150 mM NaCl-dal kiváltott sóstressz jelenlétében. Az alkalmazott ozmotikumok eltérő módon hatottak a vizsgált paraméterekre, de a mutáns növények csak néhány esetben mutattak jelentősebb eltérést a Columbia vad típushoz képest. Kéthetes csíranövények ozmotikus stressz kezelése esetén a mutánsokban alacsonyabb PEG koncentrációk hatására csökkent glutation mennyiséget, magasabb oxidált glutation arányt tapasztaltunk, míg NaCl hatására nőtt az össz aszkorbinsav és glutation mennyisége is, jelezve a növények antioxidáns védelmének aktiválódását. Az *Arabidopsis*-ban található glutation peroxidáz gének expresszióját kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció segítségével vizsgálva megállapítottuk, hogy más gének, pl. az AtGPX5 expressziója a mutánsokban megemelkedett kontroll körülmények között is, ami hozzájárulhatott a mutánsok ozmotikus stressztoleranciájának megőrzéséhez.

Kulcsfogalmak: antioxidánsok, *Arabidopsis thaliana*, glutation peroxidáz, inszerciós mutáns növények, ozmotikus stressz, sóstressz

2. Tartalomjegyzék

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2.
2. TARTALOMJEGYZÉK	3.
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.
3.1. A reaktív oxigénformák keletkezése, oxidatív stressz	4.
3.2. Az oxidatív stressz elleni védekezés	4.
3.3. A tioredoxin peroxidázok	6.
3.4. A glutation peroxidázok	6.
3.5. A növényi glutation peroxidázok	7.
3.6. Az AtGPX3 és az AtGPX2	9.
4. CÉLKITŰZÉS	10.
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11.
5.1. Kísérleti objektum	11.
5.2. A növények nevelése és mintavétel	12.
5.3. Gyökérnövekedés mérése	14.
5.4. Aktuális víztartalom meghatározása	14.
5.5. Malondialdehid tartalom mérése	15.
5.6. H ₂ O ₂ tartalom mérése	15.
5.7. Az összes-és redukált aszkorbát tartalom meghatározása	15.
5.8. Az összes-és oxidált glutation tartalom meghatározása	16.
5.9. Glutation peroxidáz gének expressziójának vizsgálata	17.
5.9.1 Primerek tervezése	17.
5.9.2 RNS kivonás	18.
5.9.3 DNáz kezelés	18.
5.9.4 cDNS írás	18.
5.9.5 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció	19.
6. KÍSÉRLETEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	20.
7. ÖSSZEFOGLALÁS	31.
8. FELHASZNÁLT IRODALOM	33.
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37.
10. FÜGGELÉK	38.
11. NYILATKOZAT	40.

3. Irodalmi áttekintés

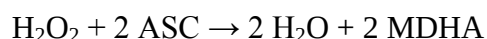
3.1. A reaktív oxigénformák keletkezése, oxidatív stressz

A reaktív oxigénformák (reactive oxygen species, ROS) keletkezése az élő szervezetekben aerob környezetben általános folyamat. Ide sorolhatók az oxigén centrumú szabad gyökök, mint a hidroxil gyök, vagy a szuperoxid gyök, de ide tartoznak olyan nem gyökös molekulák is, melyek erős oxidáló potenciállal rendelkeznek, mint például a hidrogén peroxid, vagy a szinglet oxigén. Szerepük igen összetett, káros hatásaikon kívül a jelátviteli mechanizmusokban is részt vesznek (Iqbal és mtsai, 2006). Ha képződésük sokkal nagyobb arányú, mint lebontásuk, oxidatív stressz alakul ki. Oxidatív stressznek szűkebb értelemben a reaktív oxigénszármazékok által előidézett sejtkárosodást nevezzük. A legtöbb környezeti stresszhatásnak van oxidatív komponense. A fokozott mértékben termelődő ROS hatására különböző makromolekulák oxidációja jön létre, ami a sejtek funkcionális és morfológiai károsodásához vezet. A szabadgyökök sokféleképpen reakcióba léphetnek az élő anyag szinte minden komponensével, nukleinsavakkal, lipidekkel, fehérjékkel, pigment molekulákkal és károsíthatják ezek működését. Ezen változások nagyon sok esetben irreverzibilisek, így az oxidáció a makromolekulák végleges funkcióromlását eredményezi. Az oxidatív károsodás az eredeti molekulákból szabad gyököket is képezhet (pl. lipidek esetében is), melyek felerősíthetik és láncreakció-szerűen tovább terjeszthetik a károsodást. A reaktív oxigén vegyületek egyik legkárosabb hatása a membránlipidek peroxidációja, mely során több toxikus végtermék jöhet létre, mint pl. a malondialdehid (MDA), a 13-hidroperoxi-linolénsav, vagy a 4-hidroperoxi-alkenálok. Ezek a molekulák közvetlenül is képesek károsítani a nukleinsavakat, fehérjéket, membránokat. Lipidek közül a legérzékenyebbek a többszörösen telítetlen zsírsavak és a foszfolipidek. Ezek oxidációjával a membránfluiditás csökken, nő a permeabilitás, a citoplazma és a membrán fehérjéket veszít, változik a membrán enzimatis funkciója.

3.2. Az oxidatív stressz elleni védekezés

A növények különböző védelmi rendszereket aktiválhatnak annak érdekében, hogy csökkentsék a különböző stressz faktorok miatti sejtkárosodást (Halliwell, 2006). Ezek a védelmi rendszerek antioxidáns enzimeket, valamint nem enzimatis védelmi vonalakat sorakoztatnak fel a reaktív oxigénformák eliminációjához. A karotinoidok, tokoferolok, a glutation és az aszkorbát a legfőbb nem enzimatis antioxidánsok. Az aszkorbátnak (ASC) esszenciális szerepe van a növényekben végbemenő élettani folyamatokban, köztük a

növekedésben, differenciációban és a metabolizmusban. Redukáló tulajdonságú, egyik szerepe, hogy a sejtek biokémiai folyamataiban hidrogén donorként funkcionál. Igen fontos antioxidánsnak tekinthető, úgy minimalizálja az oxidatív stressz által okozott kárt, hogy számos szabad gyökkel és más oxidáló ágenssel képes reagálni, például szuperoxiddal, hidrogén-peroxiddal, tokoferoxil gyökkel. A folyamat során monodehidroaskorbáttá (MDHA) és dehidroaskorbáttá (DHA) oxidálódik. Ha a növényt stressz éri, a MDHA/DHA mennyisége megnő, így ezek az oxidatív stressz egyik szignáljának tekinthetők (Király, 2002). Az askorbát emellett számos enzim kofaktora is, reakcióját H_2O_2 -dal az askorbát-peroxidáz katalizálja az alábbi reakció szerint (Asada, 1992):



A másik jelentős nem enzimátikus antioxidáns a glutation. A glutation (GSH) egy cisztein tartalmú tripeptid, antioxidáns funkciójának betöltésében lényeges a cisztein szulfhidril csoportja, képes redukálni DHA-t, fehérjék diszulfid hídjait. Oxidációjakor két glutation diszulfid hiddal kapcsolódik össze (GSSG). Főként redukált formában fordul elő, az összes glutation 90-99%-a redukált formában van jelen, oxidatív stressz esetén azonban a GSH/GSSG arány eltolódhat. Kimutatták, hogy a magas GSH/GSSG arány fenntartása pl. a hideg- és szárazság toleranciának fontos tényezője árpában és búzában (Kocsy és mtsai, 2002). A GSH több módon is tud antioxidánsként funkcionálni. Működhet közvetlen szabadgyök semlegesítőként, mert képes kémiaiilag reagálni a szinglet oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxiddal és hidroxil gyökkel. Stabilizálhatja a membrán struktúrát azáltal, hogy a lipid peroxidáció során keletkező acil-peroxidokat eliminálja. A glutationról is elmondható, hogy több enzim szubsztrátja. Például a glutation transzferáz szubsztrátjaként xenobiotikumok méregtelenítésében vesz részt. Védi a sejteket és részt vesz azok redukciós környezetének fenntartásában. Fontos szerepet játszik a fehérjék –SH csoportjainak védelmében, és az újonnan szintetizált fehérjék szerkezetének kialakításában. Emellett cisztein raktárként is funkcionál. A sejt redox állapotának legfontosabb meghatározója (Noctor és mtsai, 2012). A GSH védő és szabályozó szerepe függ annak redox állapotától, amit meghatároz a GSH redukáló kapacitása (GSH koncentráció), valamint a GSSG/2 GSH pár „fél-reakció” (half-cell) redukciós potenciálja (E_{hc}). Az E_{hc} a GSH és a GSSG koncentrációjából számítható a Nernst egyenlet alapján (Schafer és Buettner, 2001). Ez az érték eltér a különböző szervezetekben, szövetekben, sejtekben és sejtalkotókban, valamint változik a növény fejlődése során is (Szalai és mtsai, 2009).

Közeli kapcsolat van a sejten belüli H_2O_2 tartalom és a glutation pool állapota között. Ez jól megnyilvánul a levelek kataláz aktivitásának genetikai vagy kémiai gátlásakor. Az ilyen gátlás csekély, alig kimutatható H_2O_2 növekedést eredményez, de jelentős változást okoz a glutation pool méretében és redox állapotában egyaránt. A megnövekedett intracelluláris H_2O_2 tartalom hatása eléggé specifikus a glutationra, és csak alig észrevehető változásokat okoz más antioxidánsok és redox párok állapotában.

A nem enzimatisz antioxidánsok ROS átalakítás folyamata során maguk oxidálódnak, akár szabadgyökké is alakulnak, helyreállításuk más antioxidáns enzimek segítségével történik (Hideg és mtsai, 2006). Antioxidáns enzimek közé tartozik például a leggyakrabban vizsgált szuperoxid dizmutáz, a kataláz, a glutation reduktáz, a glutation transzferáz, a glutation peroxidáz vagy a peroxiredoxin, másnéven a tioredoxin peroxidáz is.

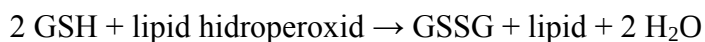
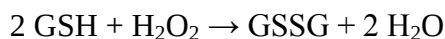
3.3. A tioredoxin peroxidázok

A növényi tioredoxin peroxidázok általában besorolhatók a peroxiredoxinok (Prx) négy alcsoportjának egyikébe. Ez a négy csoport az I Cys-Prx, a tipikus II Cys-Prx, a III típusú Prx és a Q típusú Prx. Ezeket szekvenciájuk (azaz a konzervált ciszteinek száma és helyzete), valamint a peroxid redukciónál használt mechanizmus alapján azonosították. Minden Prx N-terminális végén található egy konzervált katalitikus cisztein, mely a peroxid redukció után szulfonsavvá alakul. Az igazán lényeges különbség az alcsoportok között az enzim regenerációjában nyilvánul meg. A II Cys-Prx esetében a szulfonsav egy intermolekuláris diszulfid híd kialakulásával redukálódik egy másik alegységen lévő cisztein felhasználásával. A Q típusú Prx esetében ez a cisztein ugyanazon alegységen belül található, tehát intramolekuláris diszulfid híd jön létre. A legtöbb esetben ez a tioredoxin rendszer segítségével történik. A másik két csoport esetében nem alakul ki diszulfid híd, nem található másik konzervált katalitikus cisztein. A III típusú peroxiredoxinok a glutaredoxin és tioredoxin rendszert egyaránt képesek használni, míg az I Cys-Prx csak a tioredoxin rendszerrel képesek redukálódni (Navrot és mtsai, 2006).

3.4. A glutation peroxidázok

A glutation peroxidázok széles körben elterjedt enzimek, megtalálhatók állatokban, gombákban és növényekben egyaránt. Aminosav sorrendjük, szubsztrát specifitásuk, valamint különböző sejt-kompartimentekben való elhelyezkedésük alapján sorolták csoportokba őket. Ezek a fehérjék a reaktív oxigénformák elleni védelem kulcsenzimeit, katalizálják hidrogén-

peroxid, szerves hidroperoxidok, valamint lipid peroxidok redukcióját, mialatt glutationt vagy más redukáló komponenst, mint például tioredoxint használnak (Miao és mtsai, 2006).



A H_2O_2 -t a kataláz és különböző peroxidázok is képesek metabolizálni. Egészen az 1970-es évekig az uralkodó álláspont az volt, hogy a legfőbb H_2O_2 átalakító antioxidáns a növényekben az aszkorbát peroxidáz (APX) az emlős sejtekre jellemző glutation-függő peroxidázok helyett. Glutation peroxidázokat (GPX) azonban növényekben is azonosítottak, de az állati glutation peroxidáz enzimekhez képest a növényiek szelén-függetlenek, mivel a katalitikus helyükön ciszteint tartalmazznak szelenocisztein helyett.

3.5. A növényi glutation peroxidázok

A növényi glutation peroxidázok az állati glutation peroxidázokkal vannak legközelebbi rokonságban. Több különböző növényből izolált cDNS-t vetettek össze állati glutation peroxidázokéval és azt találták, hogy a növényi glutation peroxidázok elsődleges szerkezete az állati foszfolipid hidroperoxid glutation peroxidázokéra (PHGPX) nagyban hasonlít. Ezek a PHGPX-ek játszanak nagyon fontos szerepet a membránok oxidatív károsodással szembeni védelmében. Azonban a növényi glutation peroxidázok ciszteint tartalmazznak a katalitikus helyükön a PHGPX-ekre jellemző szelenocisztein helyett, emiatt jóval alacsonyabb az aktivitásuk. Ez az alacsonyabb aktivitás kicsit megnehezíti az enzim fiziológiai szabályozásának megismerését (Iqbal és mtsai, 2006). Azonban ha pontmutációval a ciszteint szelenociszteinre cserélték, az az enzimaktivitást drasztikusan megnövelte (Maiorino és mtsai, 1995). Nyárfában helyspecifikus mutagenézissel kimutatták, hogy két cisztein aminosav vesz részt a katalitikus ciklusban és a tioredoxin közvetített regenerációban (Cys107 és Cys155), melyek diszulfid hidat képeznek (Margis és mtsai, 2008).

Az APX-okkal ellentétben ezek az enzimek nem csak a H_2O_2 -t, de a szerves peroxidokat is ugyanolyan hatékonysággal redukálják. A katalitikus rátájuk és affinitásuk a H_2O_2 -hoz az aszkorbát peroxidázokhoz viszonyítva alacsonyabb. Ez arra enged következtetni, hogy ezeknek az enzimeknek a fő feladatuk a lipid peroxidok koncentrációjának szabályozása, melyeket a kataláz vagy az APX nem, vagy csak kevésbé metabolizál (Noctor és mtsai, 2011).

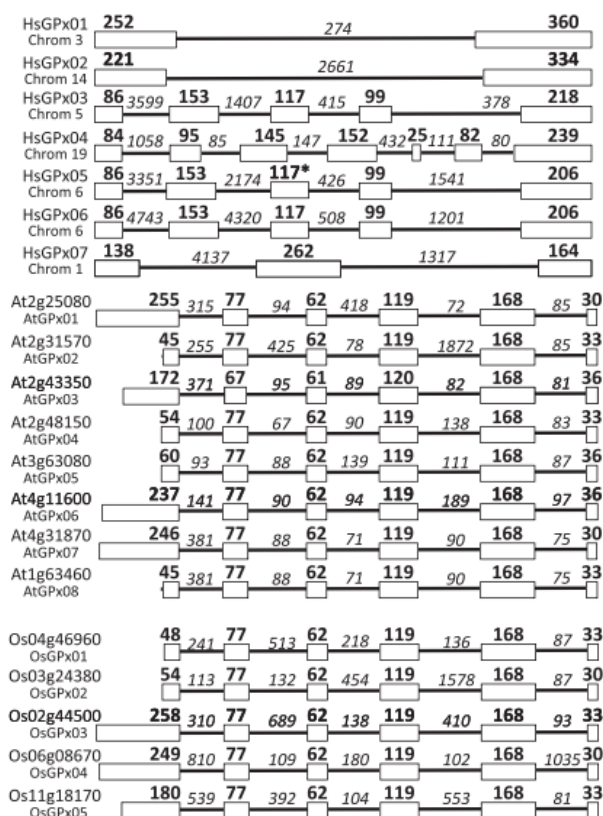
A lehetséges antioxidáns funkciókon kívül a GPX-ok részt vehetnek a redox jelátvitelben is növényekben és élesztőben (Delaunay és mtsai, 2002). Néhány élesztő és növényi glutation peroxidáz is inkább a tioredoxin rendszert részesíti előnyben a glutationnal szemben redukáló

komponensként, emiatt a növényi glutation peroxidázokat a peroxiredoxinok ötödik csoportjába sorolták (Margis és mtsai, 2008). A növények a glutationt és a tioredoxint egyaránt képesek használni, de a tioredoxin a főbb redukáló szubsztrát. Így ezek az enzimek inkább tekinthetők peroxiredoxinoknak, mint glutation peroxidázoknak.

Arabidopsis thaliana-ban a növényi glutation peroxidázok 8 tagját azonosították eddig, ezek különböző kompartmentekben lokalizálódnak, van sejtmagi, citoszolikus, kloroplasztikus, mitokondriális, apoplasztikus is (1. táblázat). A glutation peroxidáz gének szerkezeti felépítését, kromoszóma lokalizációját emberben, *Arabidopsis thaliana*-ban és *Oryza sativa*-ban az 1. ábra szemlélteti. Számos génük, mint például az *AtGPX6* oxidatív stressz hatására indukálódik. (Noctor és mtsai, 2011). Az *AtGPX1* és *AtGPX7* fotooxidatív stressz és a növényi immunválasz során is szerepet játszanak (Chang és mtsai, 2009). Irodalmi adatok alapján az *AtGPX2* és az *AtGPX3* által kódolt glutation peroxidáz enzimek fontos szerepet töltenek be a stresszhatás következtében kialakult lipidperoxidációs melléktermékek eliminálásában (Miao és mtsai, 2006, 2007).

Név	Génbank azonosító	Kromoszóma	Sejten belüli lokalizáció
AtGPX1	NP_180080	2	kloroplasztisz
AtGPX2	NP_180715	2	citoplazma/ mitokondrium/ plazmamembrán
AtGPX3	NP_181863	2	citoplazma/ mitokondrium/ Golgi apparátus/endoszóma/ transz Golgi hálózat
AtGPX4	NP_566128	2	citoplazma/ mitokondrium
AtGPX5	NP_191867	3	endoplazmatikus retikulum/ plazmamembrán
AtGPX6	AAK63967	4	citoplazma/ mitokondrium/kloroplasztisz/ plazmamembrán/ apoplaszt
AtGPX7	NP_194915	4	kloroplasztisz
AtGPX8	NC_003070	1	citoplazma/ sejtmag

**1. táblázat: Glutation peroxidázok *Arabidopsis thaliana*-ban
(TAIR - The Arabidopsis Information Resource
adatbázis) (Gaber és mtsai, 2012)**



1. ábra A glutation peroxidáz gének szerveződése, exonok (fehér téglalap) és intronok pozíciója és mérete az emberben (HsGPx), Arabidopsisban (AtGPx) és rizsben (OsGPx). (Margis és mtsai, 2008)

3.6. Az AtGPX3 és az AtGPX2

Az AtGPX3 enzim főleg a mitokondriumban/citoplazmában lokalizálódik, és feltehetően kettős szerepe van. Egyrészt a H_2O_2 és a szerves hidroperoxidok eliminálásával fontos funkciója van a H_2O_2 homeosztázisban, másrészt mint speciális kapcsoló működik az abszcizinsav és H_2O_2 jelátviteli rendszerben zárósejtekben, így szabályozva a transzspirációt (Miao és mtsai, 2006). Ugyanezen kutatócsoport eredményei alapján az *Atgpx3* inszerciós mutánsok érzékenyebbek a szárazság- és ozmotikus stresszre mint a vad típus (Miao és mtsai 2007).

Az AtGPX2 mitokondriális/citoplazmatikus enzim. Iqbal és mtsai (2006) eredményei szerint tioredoxin kosubsztrát jelenlétében képes redukálni H_2O_2 -t, kumén-hidroperoxidot, többszörösen telítetlen zsírsav hidroperoxidokat és foszfatidil-kolin hidroperoxidot is.

4. Célkitűzések

A glutation peroxidázok, így az AtGPX2, és az AtGPX3 is fontos antioxidáns enzimek, melyek feltehetően szerepet játszanak a stresszválasz során a H_2O_2 , valamint szerves hidroperoxidok eliminálásában tioredoxin kosubsztrát jelenlétében. Kísérleteink során olyan *Arabidopsis thaliana* inszerciós mutánsokat használtunk, melyekben az AtGPX2 vagy AtGPX3 kifejeződése csökkent. Mannitollal, polietilén glikollal (PEG) és NaCl-dal idéztünk elő 50-300 mOsm ozmotikus stresszt a csíranövények táptalajában. Összehasonlítottuk a Columbia vad típusú és az *Atgpx2*, *Atgpx3* mutáns növények növekedését, vízháztartási paramétereit 4 napos csíranövények 15 napig tartó ozmotikus stressz kezelése után, továbbá 2 napig tartó kezeléseket követően meghatároztuk a 16 napos növények H_2O_2 és malondialdehid (MDA) tartalmát, glutation és aszkorbát mennyiségét, valamint ezekben a növényekben a különböző glutation peroxidáz gének expressziójának alakulását.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e eltérés a vad típusú és mutáns csíranövények gyökérnövekedésében, friss tömegében, illetve aktuális víztartalmában különböző ozmotikumok jelenlétében?
- Tapasztalható-e különbség a vad típusú és mutáns növények H_2O_2 - és a lipidperoxidáció mértékét jelző malondialdehid szintjében rövid ideig (2 nap) alkalmazott ozmotikus stressz hatására?
- Hogyan változik az aszkorbát- és glutation tartalom illetve az oxidált/redukált formák aránya ozmotikus stressz esetén a különböző növényekben?
- Látható-e eltérés a vad típusú és kiválasztott mutáns növényekben a glutation peroxidáz gének expressziós szintjében ozmotikus stressz hatására?

Gatgtctagatttctcatctgaaagtaaaattatttctagagtgctgaaaaattgaagagaaaaagtgcaataaatctctcaaggctgagatgggctttaaattaggcgtaaaattatcaa
 ctgattttggccatgtaagccattaaagcttcaaacactatccaagtcaacaagctgttctgttctgttctgactctgagatgcttctgttcaccaagagaagaagactaactgtgttttt
 tcttctctgATGCCTAGATCAAGC
N671497, SALK_071176.48.65.x, ←
 AGATGG▼GTCAATCAGCGAGCTACCTCTAAGATTAATAAAATTATACTCTTTTGGGTGTAGCCTTTGTCTTCTACCTCTACAGATA
 CCCTTCTTCGCCATCGACGGTGAACAATCATCCACTTCCATCTACAACATTTCCGTTAAGgtataatcagctaaactaggaacttagaagccaat
 ttctcacactctaggtgatccgctctatatttagtctgattctgaagaatcattctaattgctgattttatgaaaaatttatgttttaagcgaatttagtaagataatgaactagacgagtg
 cttattttaaggactagtactaatgcaactgttagttagatgggaaatgacttgtttgtgtctgtgtgttttaagtgaactctcaatgactatagcccttaagtctctttagtaaacg
 agttctactagttattatcataactcataactccgtatcaatttcaaaatgaaaatgtagGATATTGAAGGGAAAGATGTGAGTTTGAGCAAGTTTACCGGGAA
 AGTGCTTCTTATAGTCAATGTAGCCTCTAAGTGgtatgttactaagtacttaattgttcttacttattgcatataatgtcacattacattggcgttatataaaaatctgtgtgatg
 aatgagcagTGGTCTAACACATGGAACTACAAAGAAATGAACATTCTGTATGCCAAGTACAAACTCAGGgtgtgtctttatctcgtctgtccttt
 ctacaggttattaaacaggtgaaatttttataagattaaaggaatgcgtttcacgcagGGTTTGAGATCTTAGCATTTCCTTGCAACCAATTTGGTAGTCAAGA
 GCCAGGCAGCAACATGGAGATCAAGGAAACCGTTTGCAATATCTTCAAAGCAGAAATTCCCAATCTTTGACAAGgtctcaagtaactgtgtct
 caatttcataacacggtgcaaaattttctagttgtttacatatctcttttcaatgcgaagATTGAAGTAATGGAAGAACACTTGTCCCTTTTACAATTTCTTAA
 AGAACAAAAAGGAGGATTGTTTGGGGATGCTATTAAGTGGAAATTCGCAAGTTTCTGGTAGACAGACAAGGAAATGTCGTTGAC
 CGATATGCTCCAACATACACTCCTCTTGAATTTGAGgttagtagaagttccctctacatttctaatcattaaaggagctactctgtgtttctcttcttctgcag
 AAGGATATCGTCAAGCTATTGGCATCTGCTTGAacatatatgtcaagggtgagtttctgtacgagctcctaagatctcaccctcctctgtgattggacaagaaacta
 attaataggtgaaagttagatagattaaataaagtgatctctgcatgtgaacatatatctgttagtagaacatggactgcaacagttgccaactctagggcagttaggttgaataact
 cctcaagctcatgggtgaaacatagaaagcaacagaatctgtgaaattgctattacattttatggccacgaatcagaactatttctctgaaatgcttaggagaccacaaggaataat
 aatgtggactgcttgggtcaggacaggagacaaaaagcgcgcacaaacatgtctgagactgagaatgaaaaccatttctatactattcttacccttcatgtttatccaaccatccat
 ggaaagaagatgctgtgtaactgtgaacctcatttctgaacaaaaccccaaaatgcttatgaaacatcaataaagaacaagtttattttctctcttattaatcatccattacaaca
 atgtctagcaaaatctcttagcatcattaatctttatatacatagtgtagcaaaagagctctacaacaatgggtgtttcaagcaggtcagctcataagagattca

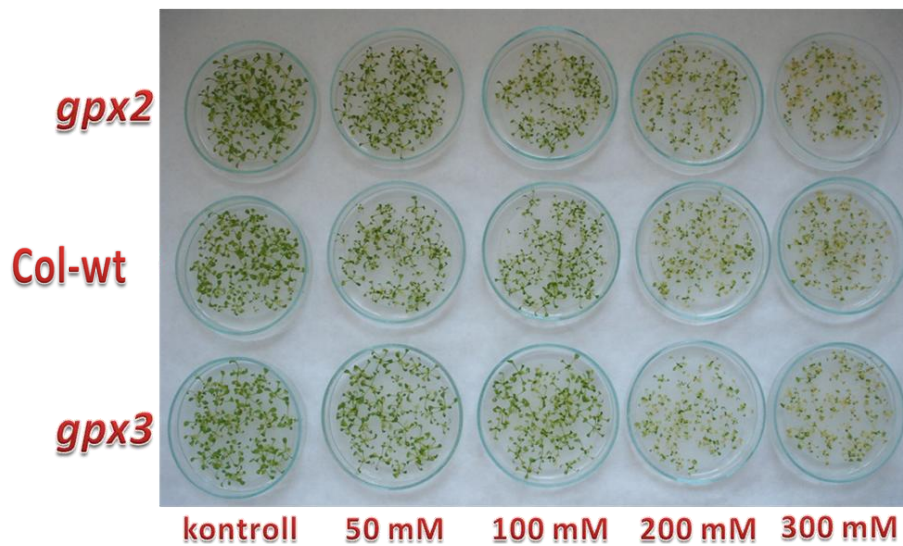
3. ábra Az AtGPX3 gén és az inszerció helye a mutánsban

(Sárga nagy betűvel az exonok, lila kis betűvel az intronok jelölve. Az inszerció helyét a piros háromszög mutatja. Aláhúzással emeltük ki a start- és a stop kodont, továbbá azokat a szekvenciariészleteket, amelyekre az ellenőrzéshez használt oligonukleotidokat terveztük)

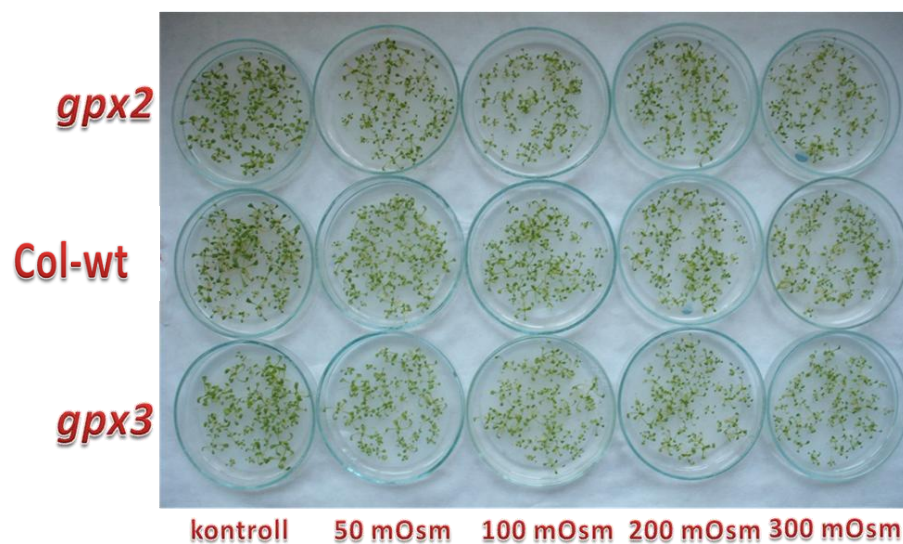
5.2. A növények nevelése és mintavétel

Steril tenyészet létesítéséhez a magokat 1 percre 1 ml 70%-os etanollal, 15 percre 1 ml 2%-os Domestos-szal, majd ötször 1 ml steril tisztított vízzel mostuk, és egy éjszakán keresztül 1 ml steril vízben 4°C-on tároltuk, majd táptalajra helyeztük őket. A táptalaj tartalmazott ½ MS-t, 0,5% szacharózt, valamint 0,8% agart. A növényeket üvegházban neveltük 180 μmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitás és 12h/12h nappal/éjszaka megvilágítás mellett, körülbelül 25°C-on.

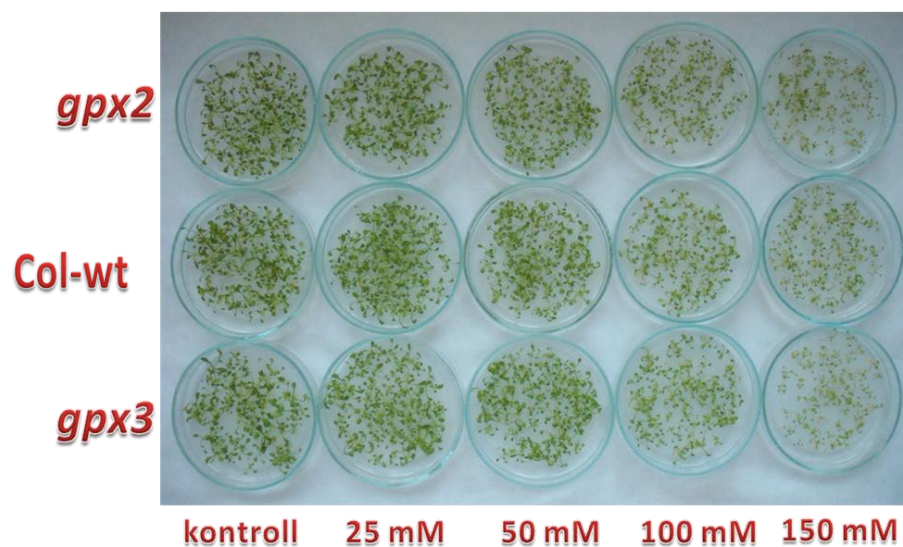
A csíranövényeket 2 hetes korukban áthelyeztük 0, 50, 100, 200, és 300 mOsm mannitol-, polietilénlikol (PEG), illetve NaCl tartalmú ½ MS táptalajra. A PEG tartalmú táptalajokat van der Weele és mtsai (2000) által leírt PEG infiltrációs módszer alapján készítettük, mivel a PEG az agarral komplexet képez autoklávozás alatt, ami miatt nem szilárdulna meg a táptalaj. 20 ml táptalajra (0,5% szacharóz tartalmú ½ MS, 1,4% agarral szilárdítva) 30 ml steril PEG oldatot rétegeztünk (Verslues és mtsai, 2006). Az oldatok ozmotikus potenciálját digitális ozmométerrel ellenőriztük. A csíranövényeket az áthelyezés után két nappal dolgoztuk fel (1.-3. kép), a H₂O₂ és malondialdehid (MDA) meghatározása után a növényi anyag egy részét -80°C-on tároltuk további felhasználásig. A kísérleteket 3 párhuzamos ismétlésben végeztük el.



1. kép Két napig tartó mannitol kezelés hatása 14 napos *Arabidopsis* csíranövényekre



2. kép Két napig tartó PEG kezelés hatása 14 napos *Arabidopsis* csíranövényekre



3. kép Két napig tartó NaCl kezelés hatása 14 napos *Arabidopsis* csíranövényekre

Gyökérnövekedés vizsgálathoz a már fent említett módon ½ MS-t tartalmazó táptalajra vetettük a magokat, majd a 4 napos csíranövényeket mannitol, NaCl, valamint PEG tartalmú táptalajra helyeztük át 15x15 cm-es, szögletes Petri-csészékbe, mindegyikbe 4-4 db *gpx2*, *gpx3* mutáns, valamint vad típusú csíranövényt raktunk. A Petri-csészéket függőlegesen állítva helyeztük el, és 15 napig figyelemmel kísértük a gyökerek növekedésének mértékét, a főgyökér növekedését naponta markerrel jelöltük. A nevelési körülmények: 14h/10h nappal/éjszaka megvilágítás, 25/20°C, 65/50% páratartalom.

5.3. Gyökérnövekedés mérése

15 nap után a Petri-csészéken lévő jelöléseket scanner segítségével rögzítettük, majd ImageJ program (4. ábra) segítségével határoztuk meg a gyökérhosszokat. Friss tömeg mérésénél az egyesített minták tömegértékeiből számítottuk ki egy csíranövény átlag tömegét.



4. ábra ImageJ program felhasználói felülete (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

5.4. Aktuális víztartalom meghatározása

A növekedés vizsgálathoz használt 12-12 növénynek megmértük a friss tömegét. Ezt követően a mintákat 24 órára 60°C-os szárítószekrénybe helyeztük. Szobahőmérsékletre történő hűlés után ismét megmértük a tömegüket (száraz tömeg). A kapott eredményekből aktuális víztartalmat számoltunk a következő képlet alapján:

$$\text{Aktuális víztartalom (\%)} = \frac{\text{friss tömeg (mg)} - \text{száraz tömeg (mg)}}{\text{friss tömeg (mg)}} \cdot 100$$

A 12 növény összesítésével kapott adatokat ábrázoltuk.

5.5. Malondialdehid (MDA) tartalom mérése (Ederli és mtsai, 1997)

MDA meghatározáshoz körülbelül 50 mg növényi anyagot pontos tömegmérés után folyékony N₂ jelenlétében eldörzsöltünk 500 µl 0,1%-os triklórecetsavval (trichloroacetic acid, TCA), valamint 50 µl 4%-os butilhidroxitoluol (BHT) oldattal és eppendorf csövekbe öntöttük, majd centrifugáltuk 4°C-on 12000 rpm fordulatszámon 20 percig. Ezt követően a felülúszó 250 µl-ét előre kilyukasztott eppendorf csövekbe pipettáztuk, és hozzá adtunk 1 ml 20%-os TCA-ban oldott 0,5% tiobarbitursavat (tiobarbituric acid, TBA), majd az eppendorfokat 30 percre 98°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd hűtés után az összes mintát 1,5-ml térfogatra egészítettük ki 20%-os TCA-ban oldott 0,5% TBA-val. Az abszorbanciát 532 nm-nél mértük, amit 600 nm-nél mért nem specifikus értékkel korrigáltunk. Az MDA tartalmat $\varepsilon=155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens felhasználásával számoltuk, és 1 g friss tömegre vonatkoztattuk.

5.6. H₂O₂ tartalom mérése (Loreto és Velikova, 2001)

A hidrogén peroxid tartalom meghatározásához körülbelül 200 mg tömegű növényi anyagot pontos tömegmérés után hűtött dörzsmozsárban eldörzsöltünk 300 µl 0,1%-os triklórecetsavval (TCA), eppendorf csövekbe töltöttük és centrifugáltuk 4°C-on 12000 rpm fordulatszámon 20 percig. A felülúszóból félkémcsőbe kimértünk 0,25 ml-t és hozzáadtunk 0,25 ml 10 mM-os foszfát puffert (pH 7,0) és 0,5 ml 1 M-os kálium jodidot. A minták fényelnyelését 390 nm-en mértük foszfát pufferrel szemben. A minták hidrogén peroxid tartalmát a már előzetesen elkészített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, majd 1 g friss tömegre vonatkoztattuk.

A szignifikáns különbségek megállapítása érdekében bizonyos esetekben az adatokat statisztikai elemzésnek vetettük alá. ANOVA varianciaanalízist követően a Duncan tesztet alkalmaztuk, a különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten.

5.7. Az összes-és redukált aszkorbát tartalom meghatározása (Law és mtsai, 1983)

Az összes és a redukált aszkorbát meghatározásához a mintákat pontos tömegmérés után (friss tömeg) 5%-os triklórecetsavban (TCA) homogenizáltuk, majd 4°C-on 12000 rpm fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk tovább a méréshez. Az összes aszkorbát meghatározásához 100 µl 10 mM dithiothreitol (DTT) adtunk a

félkémsövekhez és inkubáltuk az elegyet szobahőmérsékleten 10 percig, ezzel a lépéssel redukáltuk az összes dehidroaszorbátot. Ezt követően 100 µl N-etil-maleimidet (NEM) adtunk a reakcióelegyhez. A redukált aszorbát meghatározásához DTT és NEM helyett tisztított vizet adtunk a mintákhoz. Ezt követően az összes reakcióelegyhez hozzáadtunk 500 µl 10%-os TCA-t, 400 µl 43%-os H₃PO₄-t, 400 µl 4%-os α-α'-bipiridilt és 200 µl 3%-os FeCl₃-t. Vortexelés után 37°C-on inkubáltuk a mintákat 1 órán keresztül. A minták fényelnyelését 525 nm-en mértük 5%-os TCA-val szemben. A minták aszorbát tartalmát a már előzetesen elkészített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, majd 1 g friss tömegre vonatkoztattuk. A dehidroaszorbát mennyiségét az összes és a redukált aszorbát tartalom különbsége adta meg.

5.8. Az összes- és oxidált glutation tartalom meghatározása (Griffith, 1980)

Az összes és az oxidált glutation meghatározásához a mintákat pontos tömegmérés után (friss tömeg) 5%-os triklórecetsavban (TCA) homogenizáltuk, majd 4°C-on 12000 rpm fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk tovább a méréshez. A módszer alapja egy olyan enzimátikus reciklizálás, ami a glutation reduktáz működésén alapszik. A TNB (5-tio-2-nitrobenzoésav) keletkezés rátája egyenes arányban áll a reciklizáló reakcióval, ami viszont szintén egyenesen aránylik a minta glutation koncentrációjához. A TNB keletkezés kinetikáját 405 nm-en követhetjük spektrofotométer segítségével. A reakcióelegy tartalmazott a minták mellett 0,1 M foszfát puffert (pH 7,5), 1 mM DTNB oldatot, 1 mM NADPH-t, a reakció az élesztő enzim (GR, baker's yeast) hozzáadásával indult (1U/ml). A 2. és a 3. perc közötti abszorbancia változásából határoztuk meg a glutation mennyiségét a már előzetesen elkészített kalibrációs görbe segítségével, majd 1 g friss tömegre vonatkoztattuk. Az oxidált glutation tartalom mérése ugyan ezen alapelven működik annyi különbséggel, hogy a mintákhoz előzetesen 2-vinilpiridint adtunk, majd 1 óra elteltével trietanolaminnal inaktiváltuk a 2-vinilpiridint. Ezt követően a már fent említett módon spektrofotométerrel meghatároztuk a minták oxidált glutation tartalmát.

A GSH/GSSG redox pár redox állapotát Schafer és Buettner (2001) módszerével, a Nernst egyenlet felhasználásával, az alábbi képlet alapján kiszámított redukciós potenciállal jellemeztük:

$$E_{hc} = -240 - (59,1/2) \log ([GSH]^2/[GSSG]) \text{ mV}$$

ahol $E_{hc} = E_{GSSG/GSH}$: a glutation fél-reakció redukciós potenciálja, -240 mV: a glutation standard fél-reakció redukciós potenciálja 25 °C-on, pH=7,0 esetén (Schafer és Buettner (2001)).

5.9. Glutation peroxidáz gének expressziójának vizsgálata

5.9.1. Primerek tervezése

Arabidopsis thaliana-ban található glutation peroxidáz szekvenciák azonosításához a TAIR (The Arabidopsis Information Resource) adatbázist használtuk fel.

Az *Arabidopsis thaliana* glutation peroxidázok kódoló régióira a specifikus primereket a Primer3 Input (version 0.4.0) program segítségével terveztük (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Beállítások: az amplikon hossza 50-200 nukleotid, a primerek hossza 18-25 nukleotid, a primerek T_m hőmérséklete 59-61°C, a primerek GC tartalma 20-60%, maximális ön-komplementaritás $\Delta G = 4$ (5) kcal/mol. A kapott primerek közül az IDT-DNA (Integrated DNA Technologies, SciTools OligoAnalyzer 3.1) (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) segítségével választottuk ki a leginkább megfelelőeket, majd specifikitását az NCBI/BLAST, valamint TAIR/BLAST segítségével ellenőriztük. Ezt követően a kiválasztott primereket Szegeden az MTA SZBK Oligonukleotid Szintetizáló Laboratóriumban szintetizáltattuk meg. A felhasznált oligonukleotid szekvenciákat a 2. táblázat tartalmazza.

Gén	Szekvencia
<i>AtGPX1</i> (<i>At2g25080</i>)	F: 5' TCTCGTCCTTTCACTGTCCA 3' R: 5' CATCCTTCCCATCAATGTCC 3'
<i>AtGPX2</i> (<i>At2g31570</i>)	F: 5' CTGACGGATGCGAACTACAA 3' R: 5' GAACTGATTACACGGGAATGC 3'
<i>AtGPX3</i> (<i>At2g43350</i>)	F: 5' AGGATTGTTTGGGGATGCTA 3' R: 5' GTTTGATGCGATGCTTTTTTG 3'
<i>AtGPX4</i> (<i>At2g48150</i>)	F: 5' GAGATGGGTGCTTCTGCTTC 3' R: 5' GCAACATTGACGATGAGGAG 3'
<i>AtGPX5</i> (<i>At3g63080</i>)	F: 5' TTTTGGGGAGTGGTGGTAA 3' R: 5' CATTTTATCTCGCAGCAGCA 3'
<i>AtGPX6</i> (<i>At4g11600</i>)	F: 5' GGAGACGGCATTAAAGTGGAA 3' R: 5' GGAGTTGGTGCAGAAACGAT 3'
<i>AtGPX7</i> (<i>At4g31870</i>)	F: 5' CTGGTGGTTTCCTTGGTGAT 3' R: 5' TTGTGGGAGGGTATCTCTCG 3'
<i>AtGPX8</i> (<i>At1g63460</i>) (Gaber és mtsai, 2012)	F: 5' GATGAAGCTTTGTTGCTGAATCG 3' R: 5' TCCAAGTCAATGTCATGGCTCTT 3'
<i>GAPDH2</i> (Papdi és mtsai, 2008)	F: 5' AATGGAAAATTGACCGGAATGT 3' R: 5' CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA 3'

2. táblázat: Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciónál (qPCR) használt primerek

5.9.2. RNS kivonás

Körülbelül 100 mg növényi anyagot folyékony nitrogénben eldörzsöltünk kevés kvarchomok hozzáadásával. Vigyázva, hogy a minta ki ne olvadjon a nitrogén elpárolgása után a port hűtött eppendorfokba kapartuk, majd 1-1 ml TRIzol-reagenst (nátrium-citrát, kálium-acetát, N-lauril-szarkozin, fenol, guanídium izotiocianát és DEP-es víz) adtunk hozzájuk, majd 65°C-on inkubáltuk őket 3 percig. Ezt követően 200-200 µl kloroformot adtunk hozzájuk, majd 3 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 15 percig 4°C-on 10000 rpm-en centrifugáltuk őket. Centrifugálás után a felső vizes fázist 375 µl kloroform:izoamilalkohol (24:1) elegyet tartalmazó eppendorfokba pipettáztuk át, majd újból centrifugáltuk a mintákat 15 percig 4°C-on 10000 rpm-en. Ezután a felső vizes fázist új eppendorfokba szívtuk át, majd 500-500 µl izopropanolt adtunk hozzájuk és szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk a mintákat, majd centrifugálás következett 15 percig 4°C-on 10000 rpm-en. A csövek alján lévő csapadékokról leöntöttük a felúszót, majd kétszer 70%-os etanollal mostuk a mintákat. Miután az etanol elpárolgott, a pelletet 25 µl dietilén-pirokarbonátos (DEP) vízben oldottuk fel.

5.9.3. DNáz kezelés

A mintánk még RNS-en kívül tartalmaz genomi DNS-t is, ezért szükség van egy DNS mentesítő lépéssorozatra. 15 µl mintához 17 µl DEP-es vizet, 4 µl DNáz puffert, 0,5 µl RNáz inhibítort és 4 µl DNáz enzimet adtunk. Ezt követően 30 percig 37°C-on inkubáltuk és 10 percig 65°C-on inaktiváltuk az enzimet tartalmazó mintáinkat. A reakcióelegyekhez hozzáadtunk 150-150 µl DEP-es vizet, 150 µl fenolt és 150 µl kloroformot, majd a mintákat 10 percig 4°C-on 12000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszóhoz 200-200 µl kloroformot adtunk, majd újbóli centrifugálás következett 10 percig 4°C-on 12000 rpm-en. A felülúszóhoz 20 µl 3 M-os nátrium-acetátot és 550 µl 96%-os etanolt adtunk majd egy éjszakán át -20°C-on tároltuk a mintákat. Másnap 10 perc 4°C-on, 12000 rpm-en történő centrifugálás után a csapadékot kétszer 70%-os etanollal mostuk, majd száradás után 20 µl DEP-es vízben oldottuk fel őket. Nanodrop segítségével ellenőriztük a minták RNS tartalmát és tisztaságát.

5.9.4. cDNS írás

1 µg RNS-t tartalmazó mennyiségű mintát és DEP-es vizet PCR csövekbe kimértünk, hogy együttes térfogatuk 9 µl legyen és 5 percig 70°C-ra hevítettük őket. Ezt követően minden egyes mintához hozzáadtunk 1 µl random hexamert, 4 µl reakció puffert, 1 µl 25 mM-os dNTP mixet (Bioline), 0,5 µl RNáz inhibítort, valamint 4 µl DEP-es vizet, majd 5 percig 25°C-on tartottuk őket. Minden egyes mintához két reakcióelegy tartozik, az inkubációt

követően csupán az egyikhez adtunk 1 µl reverz transzkriptáz enzimet. A program a mintákat 1 órán keresztül 42°C-on, 10 percig 25°C-on, majd 5 percig 70°C-on tartotta. A kapott cDNS-eket ellenőriztük, majd kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciónál használtuk fel.

5.9.5. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR)

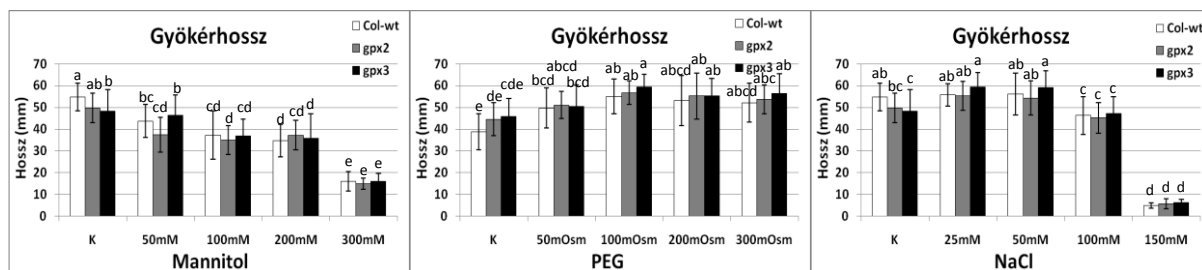
Az *Arabidopsis* glutation peroxidáz gének expressziójának mértékét qRT-PCR segítségével határoztuk meg. Minden egyes reakcióelegy tartalmazott 9 µl hússzorosára hígított cDNS-t tartalmazó mintát, 0,5-0,5 µl-t a megfelelő koncentrációra hígított primerekből (forward és reverz), valamint 10 µl-t a 2x SYBR Green PCR Master Mixből (Fermentas). Minden reakció esetén három párhuzamos mérést végeztünk. A felhasznált eszköz: MJ Research PCR készülék, BioRad detektorfejjel. A program először 10 percre 90°C-ra melegíti a mintákat, majd 41 cikluson keresztül 15 másodpercig 95°C-on és 1 percig 60°C-on tartja őket. Opticon Monitor szoftver segítségével detektáltuk a fluoreszcencia intenzitását. Az amplifikáció során keletkező termékek specifikusságát olvadási görbe vizsgálatával ellenőriztük, 55°C-tól 90°C-ig 0,2°C-onként. Referencia génként gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtunk.

A specifikus primerek használatával nyert adatokból $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel határoztuk meg a vizsgált GPX gének relatív transzkript szintjét (Livak és Schmittgen, 2001). Ennek meghatározásához a mért C_t (threshold cycle) értékekkel számoltunk. A ΔC_t értéket a vizsgált gén és a referenciagén C_t értékének különbségével kaptuk. A következő lépésben a kontroll vad típusú minták ΔC_t értékének és a vizsgált minta ΔC_t értékének különbségéből kaptuk meg a $\Delta\Delta C_t$ értéket, amit 2 negatív hatványára emeltünk.

6. Eredmények és értékelés

6.1. A csíranövények növekedése, aktuális víztartalma különböző ozmotikumok jelenlétében.

Négy napos csíranövényeket helyezve 50, 100, 200, 300 mOsm mannitol, PEG vagy NaCl tartalmú táptalajok felszínére, eltérő hatást figyelhattunk meg az egyes ozmotikumok okozta változásokban (Függelék, 4.-6. kép). Két hét elteltével a 200 és 300 mM mannitol és a 150 mM NaCl jelenléte szignifikánsan csökkentette a gyökérhossz növekedését, azonban a kísérleteinkben alkalmazott PEG kezelések nem idéztek elő növekedés gátlást, sőt 100 mOsm PEG jelenlétében a gyökérnövekedés nagyobb volt, mint a kontroll táptalajon (5. ábra). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a PEG oldatokkal történő 24 órás infiltráció nem eredményezett ugyanakkora ozmotikus potenciál csökkenést, mint a táptalaj kiegészítése mannitollal vagy NaCl-dal. A 300 mOsm ozmotikus koncentrációjú (-0,734 MPa) PEG hatására a csíranövények gyökérzetén jóval kevesebb oldalgyökér figyelhető meg, mint a kontroll növényekben, azonban általánosságban megállapítható, hogy a Columbia vad típus és a mutánsok között szignifikáns különbség nem volt tapasztalható sem a főgyökerek növekedését, sem az oldalgyökerek számát illetően.

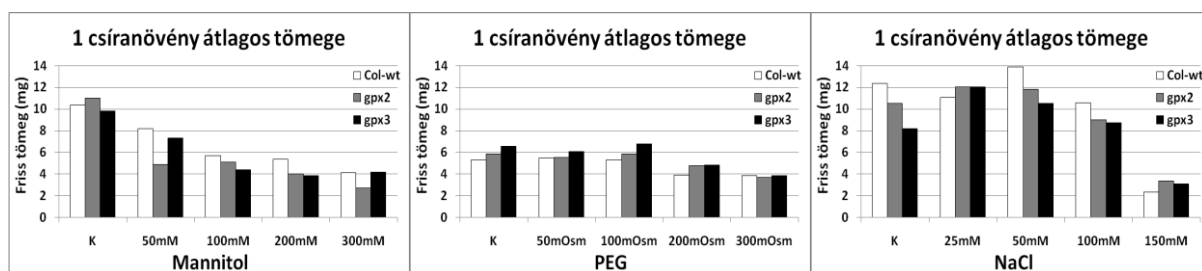


5. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények gyökérnövekedése kéthetes ozmotikus stressz kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

A 12 csíranövény együttes friss tömegének lemérése után meghatározott átlagos csíranövény friss tömeg érték a hossznövekedéshez hasonló tendencia szerint változott az egyes ozmotikumok jelenlétében, bár egyes esetekben jelentősebb különbségek voltak megfigyelhetők a kontroll és mutáns csíranövények között (6. ábra). Mannitol hatására a vad típusú és *Atgpx3* mutáns csíranövények esetében a koncentráció emelkedésével fokozatos tömegcsökkenés figyelhető meg, míg az *Atgpx2* mutánsnál már 50 mM mannitol kezelés felére csökkentette a csíranövények friss tömegét. PEG kezelés esetén az egy csíranövény átlagos tömege alacsonyabb PEG koncentrációknál nem változott, de csökkent 200 és 300

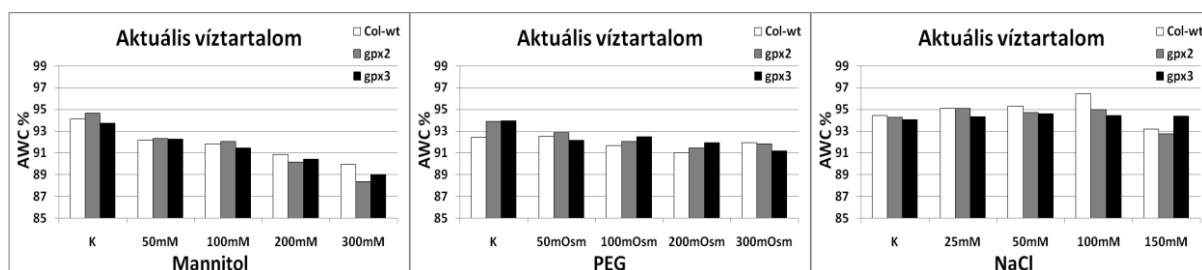
mOsm PEG hatására. NaCl jelenlétében a csíranövények tömege kisebb koncentrációknál bizonyos esetekben növekedett, de 150 mM NaCl jelentősen lecsökkentette. Mannitol és NaCl jelenlétében a mutáns növények gyakran alacsonyabb tömeget értek el, mint a vad típusú csíranövények, de a PEG-kezelt kontrollok és 100 mOsm PEG, 25 mM NaCl esetén az *Atgpx3* tömege meghaladta a vad típusét (6. ábra). A változások hátterében állhat a csíranövények szervesanyag mennyiségének illetve víztartalmának különbsége.



6. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények friss tömege kéthetes ozmotikus stressz kezelés után.

Az aktuális víztartalom alakulását a 7. ábra mutatja. Adataink alátámasztják, hogy - különösen alacsonyabb ozmotikus koncentrációk esetében - a víztartalom meghatározó tényezője a friss tömeg értékek változásának. PEG jelenlétében az *Atgpx3* csíranövények általában magasabb víztartalommal is rendelkeztek, mint a Columbia vad típus, de pl. 100 mM NaCl-dal előidézett stressz esetében a mutánsok víztartalma volt alacsonyabb (10. ábra).

Az alkalmazott ozmotikumok közül a PEG nagy molekulatömegű polimer, amely irodalmi adatok alapján nem jut be a sejtbe, míg a másik két ozmotikumot felveheti a növény. A felvett ozmotikumok mennyisége, illetve Na^+ esetében az ionok vakuólumba vagy sejten kívülre juttatása különböző lehet a kontroll és mutáns növényekben, ami eltérő víztartalomhoz vezethet. Sóstressz esetén a növények Na^+ tartalmának meghatározása további terveink között szerepel.

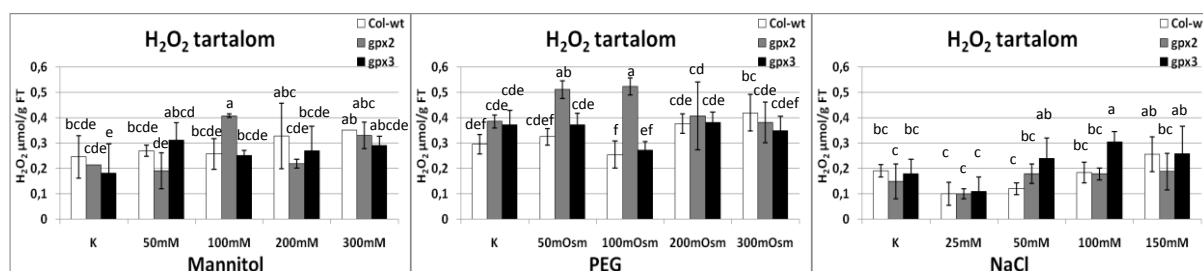


7. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények aktuális víztartalmának változása kéthetes ozmotikus stressz kezelés hatására.

6.2. A csíranövények H₂O₂ és MDA tartalma különböző ozmotikumok jelenlétében

További vizsgálatainkban a csíranövényeket két hétig kontroll körülmények között, ½ MS táptalajon neveltük. A kéthetes csíranövényeket helyeztük 50, 100, 200, 300 mOsm mannitol, PEG vagy NaCl tartalmú táptalajokra és két nap után határoztuk meg a fiziológiai és molekuláris folyamatokban bekövetkezett változásokat.

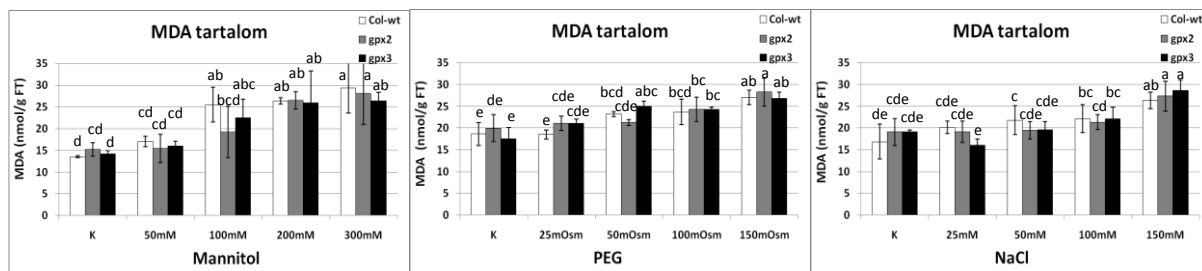
Két nap elteltével a H₂O₂ tartalomban, valamint a lipidperoxidáció mértékét jelző MDA mennyiségben ozmotikus stressz hatására kismértékű növekedést tapasztaltunk. A H₂O₂ mennyiség értékei a vad típusú és mutáns növényekben néhány kivételtől eltekintve hasonlóan alakultak (8. ábra). 100 mM mannitol, illetve 50 és 100 mOsm PEG hatására az *Atgpx2* mutánsokban, 50 illetve 100 mM NaCl kezeléskor pedig az *Atgpx3* mutánsokban figyeltünk meg magasabb H₂O₂ tartalmat a vad típushoz képest. Ezek a különbségek azonban magasabb koncentrációknál már nem láthatók, jelezve az antioxidáns védekezési mechanizmus hatékony aktiválódását a növényekben mindhárom stressz kezelés esetén.



8. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények H₂O₂ tartalmának változása két napig tartó ozmotikus stressz kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

A MDA tartalom alakulását a 9. ábra mutatja. Mindhárom ozmotikum hatására hasonló, emelkedő tendencia figyelhető meg az értékekben, ezenkívül a vad típusú és mutáns növények között nem látható jelentős eltérés. A MDA a membránok károsodásának mértékét jelzi. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mutáns növények nem szenvedtek nagyobb károsodást, mint a vad típusú csíranövények, ami arra utal, hogy a mutáns növényekben is hasonlóan működik az antioxidáns védőrendszer, mint a Columbia vad típusban.



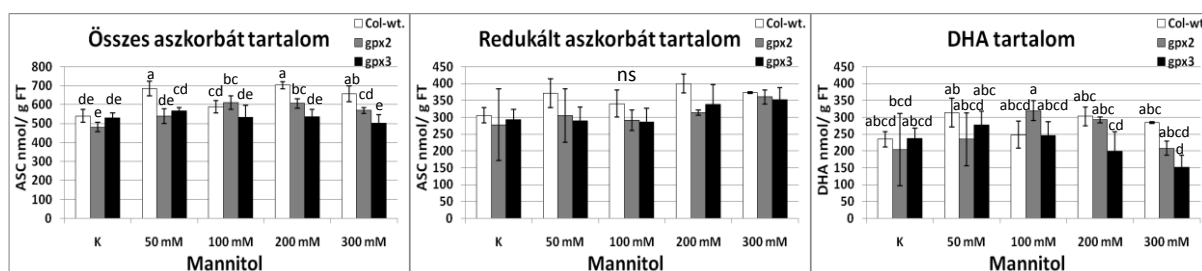
9. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények MDA tartalmának változása két napig tartó ozmotikus stressz kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

6.3. A csíranövények aszkorbát- és glutation tartalma, valamint azok redukált és oxidált formáinak alakulása különböző ozmotikumok jelenlétében

A különböző ozmotikumok hatását az összes-, a redukált aszkorbát és a dehidroaszkorbát (DHA) mennyiségek alakulására mutatja a 10-12. ábra.

Mannitol jelenlétében csak a vad típusú csíranövények esetében figyelhető meg kis mértékű össz aszkorbát tartalom emelkedés, a mutánsokban nem látható jelentős változás. Ugyanez elmondható a redukált aszkorbát mennyiségekre is, azonban a dehidroaszkorbát tartalmak eltérően alakultak. Kis koncentrációjú mannitol kezelés hatására a DHA tartalom emelkedését figyelhetjük meg, különösen az *Atgpx2* mutáns esetében 100 mM mannitol koncentrációnál. Nagyobb koncentrációnál (300 mM) azonban a DHA tartalom a mutánsok esetében lecsökkent a vad típushoz képest, ami az oxidált forma hatékony visszaredukálására utal (10. ábra).



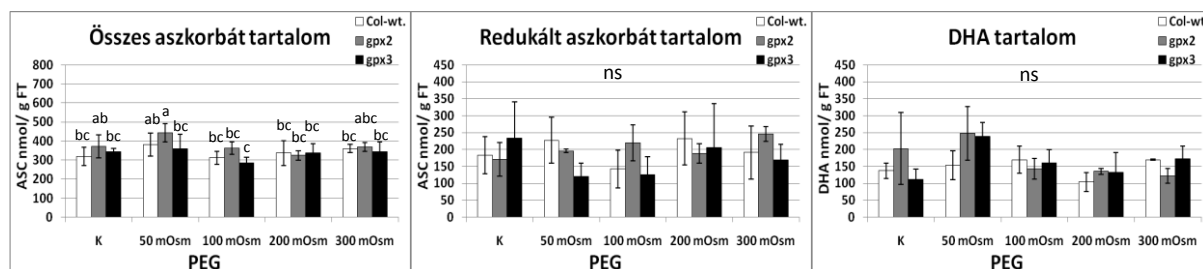
10. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált aszkorbát, dehidroaszkorbát és összes aszkorbát tartalmának változása két napig tartó mannitol kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

ns = nem szignifikáns

PEG kezelés hatására sem a vad típusú, sem a mutáns növényekben nem látható nagy változás az össz aszkorbát tartalomban, azonban alacsonyabb PEG koncentrációnál (50 mOsm) a redukált forma mennyiségének csökkenése figyelhető meg *Atgpx3* mutáns csíranövények

esetében. Ugyanezen koncentrációnál pedig a dehidroaszorbát tartalom emelkedése látható a mutáns növényekben. Magasabb PEG koncentráció hatására azonban mind a redukált-, mind az oxidált forma esetében a kontrollhoz közeli értékeket kaptunk (11. ábra).

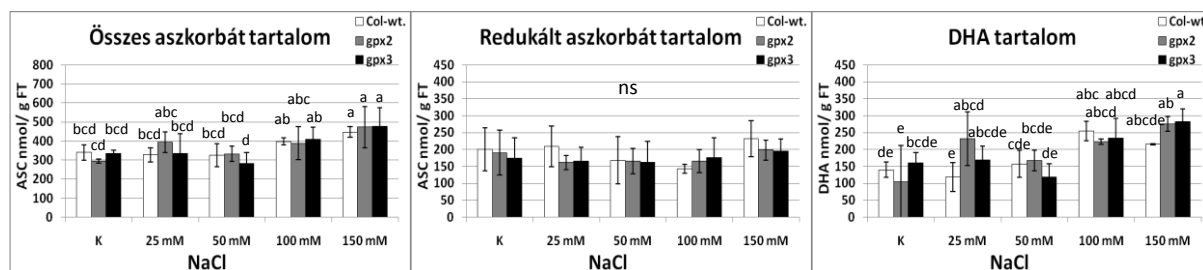


11. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált aszkorbát, dehidroaszorbát és összes aszkorbát tartalmának változása két napig tartó PEG kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

ns = nem szignifikáns

NaCl kezelés hatására magasabb koncentrációknál az össz aszkorbát tartalomban emelkedést tapasztaltunk a vad típusú és a mutáns csíranövényekben egyaránt, de a redukált forma mennyisége nem változott. Ugyanakkor növekvő DHA mennyiségeket figyelhattunk meg magasabb koncentrációknál a növényekben, sőt, 150 mM NaCl koncentrációnál a mutáns csíranövények esetében a DHA tartalom értékei meghaladták a vad típusúét (12. ábra).

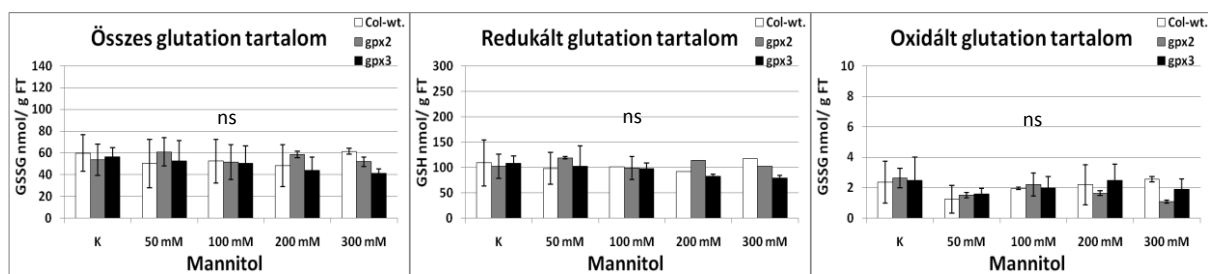


12. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált aszkorbát, dehidroaszorbát és összes aszkorbát tartalmának változása két napig tartó NaCl kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

ns = nem szignifikáns

A glutation tartalom alakulásában mannitol kezelés hatására nem láthatók igazán nagy változások. Magasabb, 300 mM mannitol koncentráció esetén tapasztaltunk eltérést a Columbia vad típus és a mutáns növények között: a mutáns növényekben mind az össz-, a redukált- és az oxidált glutation értékek alacsonyabbak voltak a vad típusúhoz képest, az eltérések azonban nem bizonyultak szignifikánsnak (13. ábra).

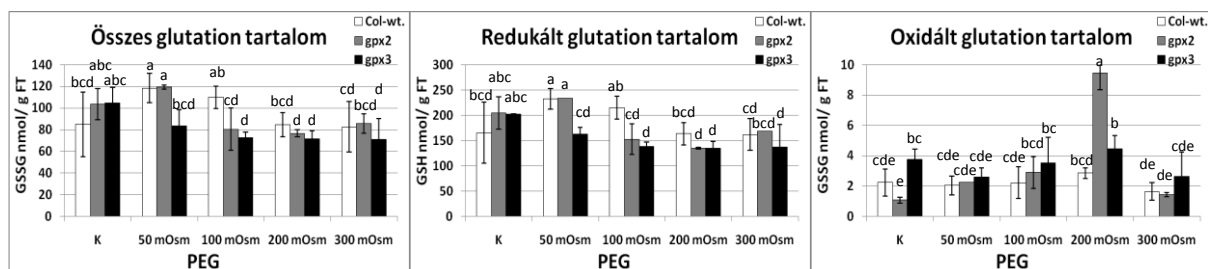


13. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált, oxidált és összes glutation tartalmának változása két napig tartó mannitol kezelés hatására.

Az értékek nem különböznek szignifikánsan egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

ns = nem szignifikáns

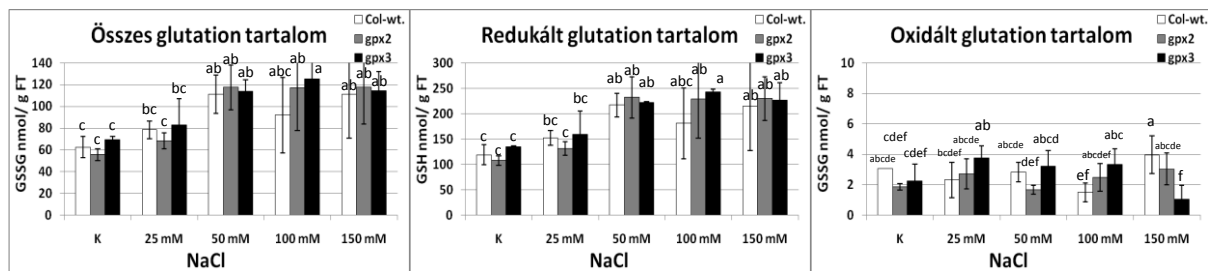
PEG kezelés hatására csökkenő össz glutation tartalom figyelhető meg a Columbia vad típusú és a mutáns növényekben egyaránt. *Atgpx3* mutáns esetében 50 mOsm, *Atgpx2* mutáns esetében 100 mOsm, vad típusú növényeknél pedig 200 mOsm PEG kezeléstől látható csökkenés az összes és redukált glutation mennyiségekben. Az oxidált glutation tartalom alakulásában azonban teljesen más a tendencia. Vad típusú növények esetén 300 mOsm PEG csökkenést idézett elő az oxidált glutation formában. A mutáns csíranövények esetében 200 mOsm PEG koncentrációig emelkedő tendenciát (főleg az *Atgpx2* mutáns esetében, ahol a kontrollhoz viszonyítva közel 10-szeres növekedés tapasztalható), majd magasabb koncentrációnál jelentős csökkenést mutat az oxidált glutation tartalom (14. ábra).



14. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált, oxidált és összes glutation tartalmának változása két napig tartó PEG kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

NaCl kezelés hatására a másik két ozmotikus kezeléstől eltérően növekvő tendencia figyelhető meg a glutation tartalmakban. 50 mM NaCl koncentrációtól mind a vad típusú növények, mind a mutánsok összes- és redukált glutation tartalma jelentősen nőtt. Azonban az oxidált glutation tartalmakban nagy változásokat általában nem tapasztaltunk NaCl hatására, de bizonyos esetekben, pl. az *Atgpx3* mutánsban 150 mM NaCl hatására, alacsonyabb oxidált glutation szinteket mértünk (15. ábra).



15. ábra Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövények redukált, oxidált és összes glutation tartalmának változása két napig tartó NaCl kezelés hatására.

A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól (Duncan teszt, $p \leq 0,05$)

Eredményeink arra utalnak, hogy az aszkorbát-glutation rendszer jelentős szerepet tölthet be a vizsgált növények antioxidáns védekezésében. Az oxidált formák aránya stressz hatására csak átmenetileg nőtt meg bizonyos koncentrációknál, vagyis a növények a védelmi mechanizmusok aktiválásával, a redukált formába történő fokozott átalakítással és/vagy az össz antioxidáns mennyiségének megnövelésével reagáltak a megváltozott ozmotikus környezetre. Ennek eredményeként a glutation és aszkorbát mennyiségben, redukált/oxidált arányban is csak kisebb különbségek voltak kimutathatók mind a mutáns, mind a vad típusú *Arabidopsis* növényekben az ozmotikus stressz kezelése után két nappal. A növények redox állapotát irodalmi adatok szerint elsősorban a glutation redox pár koncentrációja és redukációs kapacitása határozza meg (Kranter és mtsai. 2006, Noctor és Foyer 2011, 2012). A fenti adatokból számított redox potenciál értékek a kontroll és 300 mOsm ozmotikus stressz kezelése esetén a 3. táblázatban láthatók. Az adatok alátámasztják, hogy a sejtek redox állapota nem változik jelentősen a vad típusúhoz képest kontroll körülmények között, 300 mOsm ozmotikus stressz hatására PEG és NaCl jelenlétében pedig még negatívabbá válik. Ennek oka lehet a GSSG csökkenése (PEG kezelésnél), illetve a megemelkedett glutation koncentráció (NaCl esetén).

	Kontroll	300 mM mannitol	300 mOsm PEG	150 mM NaCl
Col-wt.	-260,69 ± 1,15	-261,64 ± 0,58	-275,54 ± 7,34	-271,45 ± 13,65
<i>Atgpx2</i>	-257,60 ± 5,40	-268,90 ± 0,85	-278,19 ± 1,16	-276,65 ± 9,11
<i>Atgpx3</i>	-259,77 ± 5,03	-255,15 ± 7,42	-265,23 ± 11,63	-290,00 ± 3,76

3. táblázat A glutation redoxpárra számított E_{hc} értékek kontroll és 300 mOsm ozmotikus stressz hatására Columbia vad típus, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns *Arabidopsis* csíranövényekben.

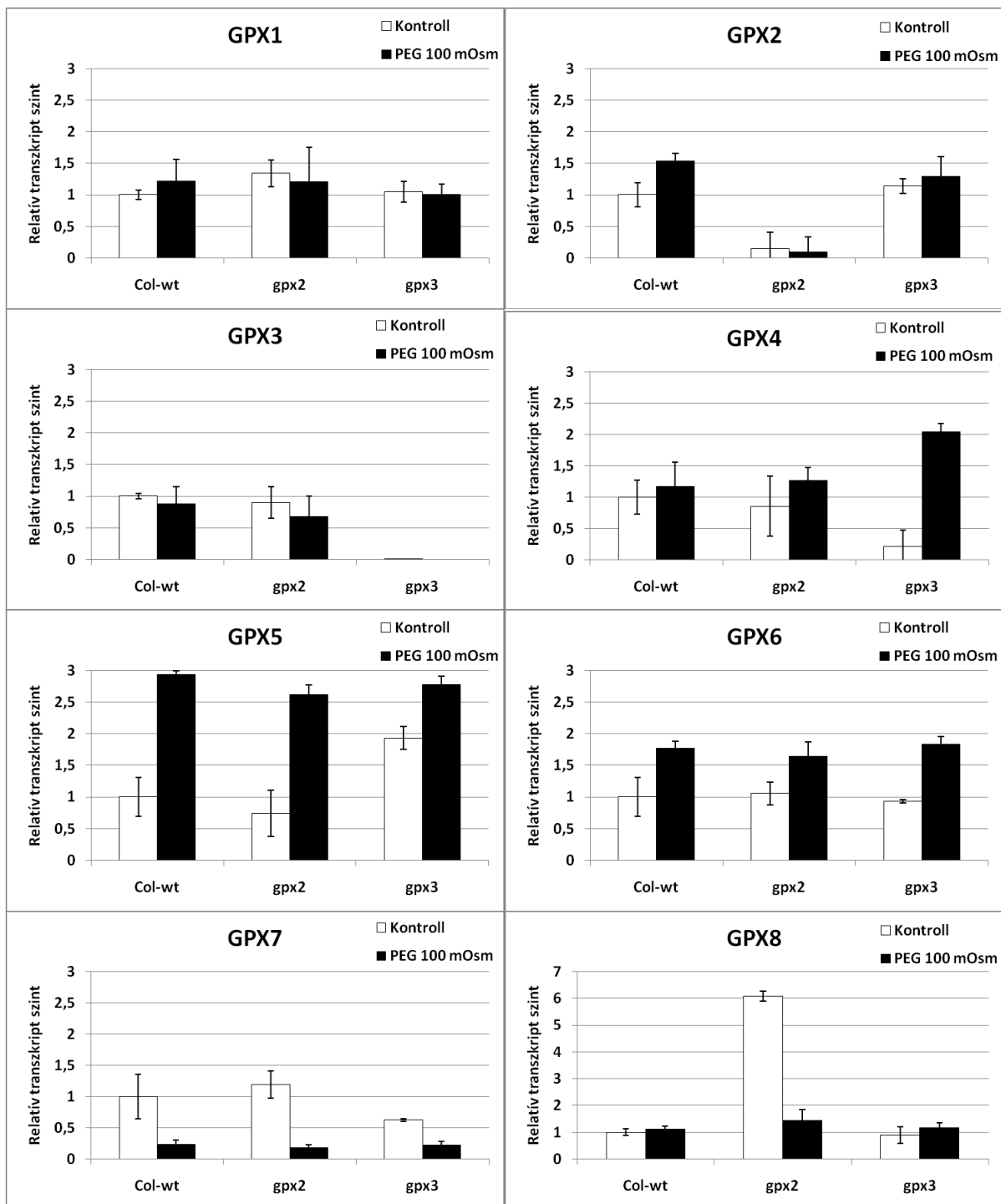
6.4. Columbia vad típusú, *Atgpx2* és *Atgpx3* mutáns csíranövényekben az *Arabidopsis* glutation peroxidáz gének expressziójának vizsgálata

Megvizsgáltuk az *Arabidopsis* glutation peroxidáz gének (*AtGPX1-8*) expressziójának alakulását a vad típusú és a mutáns növényekben kontroll körülmények között és 100 mOsm PEG, valamint 50 mM NaCl kezelés esetén. A génekre specifikus primereket terveztünk (2. táblázat), és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció segítségével határoztuk meg a vizsgált GPX gének relatív transzkript szintjét a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) gént használva belső kontrollként (Papdi és mtsai, 2008). A Columbia vad típus kontroll minták esetén mért expressziós értékeket tekintettük egységnyinek minden gén esetében.

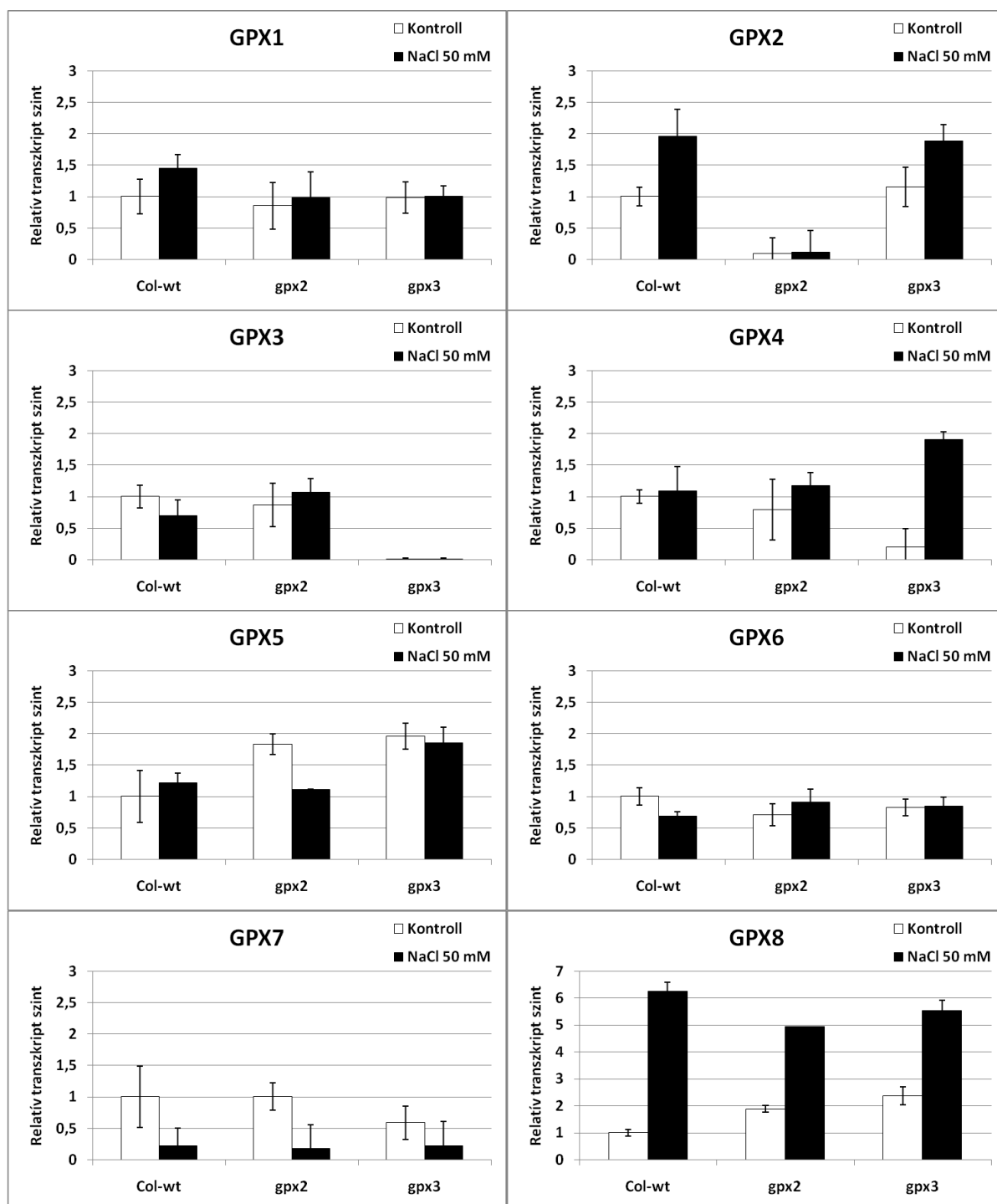
A várakozásnak megfelelően, az *Atgpx2* inszerciós mutánsban a *GPX2* (*AtGPX2*) gén, az *Atgpx3* inszerciós mutánsban pedig a *GPX3* (*AtGPX3*) gén relatív transzkript szintje igen alacsony volt mind a kontroll, mind a stressz kezelt mintákban (16. és 17. ábra). Kontroll körülmények között a PEG kezelés esetében (1,5%-os agar tartalmú táptalajon) az *Atgpx3* mutánsnál az *AtGPX5* expressziójában, *Atgpx2* mutánsnál pedig az *AtGPX8* expressziójában tapasztaltunk jelentősebb transzkript szint növekedést a vad típushoz viszonyítva, NaCl kezelés esetén (0,8%-os agar jelenlétében) kontroll körülmények között mindkét mutánsnál magasabb volt az *AtGPX5* és *AtGPX8* expressziós szintje a vad típushoz képest, vagyis ezeknek a géneknek a terméke feltehetően hozzájárul a mutáns növények GPX funkciójának megőrzéséhez.

PEG kezelés hatására a Columbia ökotípusban az *AtGPX5* transzkript mennyisége emelkedett meg legjobban, kismértékben még az *AtGPX6* kifejeződése indukálódott, míg az *AtGPX7* expressziója gátlódott. *Atgpx2* mutánsok esetében 100 mOsm PEG kezelés hatására kis mértékben a *AtGPX6*, nagyobb mértékben a *AtGPX5* gén indukálódott, az *Atgpx3* növényekben ezek mellett a *AtGPX4* gén indukciója is megfigyelhető. A PEG kezelés szignifikánsan csökkentette a *AtGPX7* gén expressziójának mértékét a vad típusú és mutáns csíranövényekben egyaránt.

NaCl kezelés hatására a Columbia vad típusban az *AtGPX8* jelentősen indukálódott, valamint az *AtGPX2* transzkript szintje emelkedett meg, azonban az *AtGPX7* expressziója gátlódott. *Atgpx2* mutánsok esetében 50 mM NaCl kezelés hatására az *AtGPX8* gén indukálódott, az *Atgpx3* növényekben az *AtGPX8* indukciója mellett az *AtGPX2*, *AtGPX4* és *AtGPX5* emelkedett transzkript szintje is megfigyelhető. A NaCl - a PEG kezeléshez hasonlóan - csökkentette a *GPX7* gén expressziójának mértékét a vad típusú és mutáns csíranövényekben egyaránt.



16. ábra *Arabidopsis thaliana* glutation peroxidáz gének relatív transzkript szintjének változása 2 napig tartó PEG kezelés hatására



17. ábra *Arabidopsis thaliana* glutation peroxidáz gének relatív transzkript szintjének változása 2 napig tartó NaCl kezelés hatására

Az *AtGPX* gének expressziójának változása tehát része a növények ozmotikus stressz válaszában. A géntermékek jelentőségét mutatja, hogy az egy-egy gén mutációjában bekövetkezett változás esetén más GPX gének termékeinek expressziója megnő, vagyis a növényekben egy nagyon jól szabályozott rendszer működik a GPX fehérjék funkciójának megőrzésére. Az eredmények alapján a *GPX7* down-regulációja, valamint a *GPX8* (NaCl kezelésnél) és *GPX5* (PEG kezelésnél) indukciója a legmarkánsabb változás, amely mindhárom típusú növényben hasonló mértékű volt, ami szintén hozzájárulhat a növények hasonló ozmotikus stressz válaszához.

7. Összefoglalás

A glutation peroxidázok széles körben elterjedt, fontos antioxidáns enzimek, melyek szerepet játszanak a stresszválasz során a H_2O_2 , valamint szerves hidroperoxidok eliminálásában. Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a kiválasztott GPX fehérjék jelentős szerepet töltenek be a stresszválaszban különböző oxidatív stressz esetén, ezt inszerciós mutánsok alkalmazásával tanulmányoztuk.

Kísérleteink során olyan *Arabidopsis thaliana* mutánsokat használtunk, melyekben egy-egy növényi glutation peroxidáz gén, az *AtGPX2* vagy *AtGPX3* kifejeződése csökkent. Összehasonlítottuk ezen mutánsok, valamint a Columbia vad típusú növények növekedését, vízháztartási paramétereit 4 napos csíranövények 15 napig tartó ozmotikus stressz kezelése során 50, 100, 200, 300 mOsm mannitol, PEG vagy NaCl jelenlétében. Általánosságban megállapítható, hogy a Columbia vad típus és a mutánsok között szignifikáns különbség nem volt tapasztalható sem a főgyökerek növekedését, sem az oldalgyökerek számát illetően. A kísérleteinkben alkalmazott PEG kezelések nem idéztek elő növekedés gátlást, sőt 100 mOsm PEG jelenlétében a gyökérnövekedés nagyobb volt, mint a kontroll táptalajon, azonban pl. 200 és 300 mM mannitol és a 150 mM NaCl alkalmazása szignifikánsan csökkentette a gyökérhosszak növekedését. Az átlagos csíranövény friss tömeg érték a hossznövekedéshez hasonló tendencia szerint változott az egyes ozmotikumok jelenlétében, bár egyes esetekben jelentősebb különbségeket tapasztaltunk a kontroll és mutáns csíranövények között.

Kéthetes csíranövényeket helyezve 50, 100, 200, 300 mOsm mannitol, PEG vagy NaCl tartalmú táptalajokra, 2 napig tartó kezeléseket követően határoztuk meg a növények H_2O_2 és MDA tartalmát, glutation és aszkorbát mennyiségét, valamint ezekben a növényekben a különböző glutation peroxidáz gének expressziójának alakulását.

A H_2O_2 tartalomban, valamint a lipidperoxidáció mértékét jelző MDA mennyiségben ozmotikus stressz hatására kismértékű növekedést tapasztaltunk. A H_2O_2 és MDA mennyiségek értékei a vad típusú és mutáns növényekben néhány kivételtől eltekintve hasonlóan alakultak. Az ozmotikumok alacsonyabb koncentrációjánál a mutáns növényekben magasabb volt a H_2O_2 tartalom, de - feltehetően az antioxidáns védekezési mechanizmus hatékony aktiválódása miatt - magasabb koncentrációknál ez mérséklődött.

A különböző ozmotikus stressz kezeléseknél a glutation és aszkorbát tartalom, valamint ezek redukált és oxidált formáinak mennyiségi meghatározását követően megállapítható, hogy az oxidált formák aránya stressz hatására csak átmenetileg nőtt meg bizonyos koncentrációknál, vagyis a növények a redukált formába történő fokozott átalakítással és/vagy az össz

antioxidánsok mennyiségének megnövelésével reagáltak a megváltozott ozmotikus környezetre. A GSH/GSSG redox pár koncentrációból számított E_{hc} értékek alapján azt is elmondhatjuk, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns növények hasonlóan képesek fenntartani a sejtek redox állapotát a különböző ozmotikus stressz hatására is.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük az *Arabidopsis* glutation peroxidáz gének (*AtGPX1-8*) expressziójának alakulására 100 mOsm PEG valamint 50 mM NaCl kezelés esetén a vad típusú és a mutáns növényekben. PEG hatásának vizsgálatakor *Atgpx3* mutánsban az *AtGPX5* expressziójában, *Atgpx2* mutánsban pedig az *AtGPX8* expressziójában tapasztaltunk jelentősebb transzkript szint növekedést a vad típushoz viszonyítva kontroll körülmények között. NaCl kezelés esetén mindkét mutáns esetében az *AtGPX5* és *AtGPX8* expressziós szintje magasabb volt, mind a vad típusban. Ez arra utal, hogy ezen gének termékei feltehetően hozzájárulnak a mutáns növények GPX funkciójának megőrzéséhez. Az eredmények alapján a *GPX7* down-regulációja és a *GPX5* illetve *GPX8* indukciója a legjelentősebb változás, amely mindhárom típusú növényben hasonló mértékű volt, és ami szintén hozzájárulhat a hasonló stressz válaszhoz.

Tehát az *Atgpx2* és *Atgpx3* inszerciós mutánsok ozmotikus stressz válaszána tanulmányozása során kapott eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált gének expressziójának jelentős csökkentését a növények kompenzálni tudták, részben más *AtGPX* gének expressziójának fokozásával, részben az antioxidáns védelmi mechanizmus más elemeinek aktiválása révén.

8. Felhasznált irodalom

- Asada**, K. (1992). Ascorbate peroxidase – hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology* 85(2), 235-241.
- Chang**, C. C. C., Ślesak, I., Jordá, L., Sotnikov, A., Melzer, M., Miszalski, Z., Mullineaux, P. M., Parker J. E., Karpińska, B. és Karpiński, S. (2009). *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiology*, 150(2), 670–683.
- Cho**, D., Shin, D., Jeon, B. W. és Kwak, J. M. (2009). ROS-mediated ABA signaling. *Journal of Plant Biology*, 52(2), 102–113.
- Dayer**, R., Fischer, B. B., Eggen, R. I. L. és Lemaire, S. D. (2008). The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179(1), 41–57.
- Delaunay**, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J. és Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4), 471–481.
- Ederli**, L., Pasqualini, S., Batini, P. és Antonielli, M. (1997) Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 151(4) 422 – 428.
- Eshdat**, Y., Holland, D., Faltin, Z. és Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 234–240.
- Faltin**, Z., Holland, D., Velcheva, M., Tsapovetsky, M., Roeckel-Drevet, P., Handa, A. K., Abu-Abied, M., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y. és Perl, A. (2010). Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for *in Vitro* plant differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1151–1162.
- Gaber**, A. (2011). Glutathione peroxidase 8 is a key enzyme in response to environmental stresses. *Arab Journal of Biotechnology*, 14(2), 213–224.
- Gaber**, A., Ogata, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Tamoi, M. és Shigeoka, S. (2012). The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. *Plant and Cell Physiology*, 53(9), 1596–1606.

- Griffith, O. W.** (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207–212.
- Halliwell, B.** (2006). Reactive species and antioxidants . Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(June), 312–322.
- Hideg, É., Csiszár, J., Horváth, V. G. és Erdei, L.** (2006) Az oxidatív stressz és aszálykárók. In: A búza nemesbítésének tudománya, A funkcionális genomikától a vetőmagig. Szerk.: Dudits Dénes. MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair, 2006, pp 137-147.
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y. és Shigeoka, S.** (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS Journal*, 273(24), 5589–97.
- Király, Z.** (2002). Az oxidatív stressz és az antioxidánsok szerepe a növény/patogén kapcsolatokban. *Acta Agraria Debreceniensis* (<http://www.date.hu/acta-agraria/2002-09/kiraly.pdf>)
- Kocsy, G., Szalai, G. és Galiba, G.** (2002). Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat. *The Scientific World JOURNAL*, 2, 1726-1732.
- Kranner, I., Birtić, S., Anderson, K. M. és Pritchard, H. W.** (2006). Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 2155-2165.
- Law, M. Y., Charles, S. A. és Halliwell, B.** (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *The Biochemical Journal*, 210(3), 899–903.
- Livak, K. J. és Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *METHODS*, 25, 402–408.
- Loreto, F. és Velikova, V.** (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127(4), 1781–7.

- Maiorino**, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohé, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, Ursini, F. és Flohé, L. (1995). Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 376(11), 651–60.
- Margis**, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., és Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959–70.
- Miao**, Y., Guo, J., Liu, E., Li, K., Dai, J., Wang, P., Chen, J. és Song, C.-P. (2007). Osmotically stress-regulated the expression of glutathione peroxidase 3 in *Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin*, 52(1), 127–130.
- Miao**, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X.-C., Chen, J., Miao, C. és Song, C.-P. (2006). An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell*, 18(10), 2749–66.
- Milla**, M. a. R., Maurer, A., Huete, A. R. és Gustafson, J. P. (2003). Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, 36(5), 602–615.
- Navrot**, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D. B., Issakidis E., Jacquot J.-P. és Rouhier N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 142(4), 1364–79.
- Noctor**, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. és Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book*, 9(1), 1–32.
- Noctor**, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Queval, G. és Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35, 454–84.
- Papdi**, Cs., Ábrahám, E., Joseph, M. P., Popescu, C., Koncz, Cs. és Szabados, L. (2008). Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiology*, 147(2), 528–542.

Schafer, F. Q. és Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191-1212.

Szalai, G., Kellős, T., Galiba, G. és Kocsy G. (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 66-80.

van der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E. és Baskin, T. I. (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1555–62.

Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. és Zhu, J-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45, 523-539.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Növénybiológiai Tanszék tanszékvezetőjének, Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irmának, aki lehetővé tette, hogy a kísérleteket a Növénybiológiai Tanszéken végezhessem.

Különösen hálás vagyok témavezetőm, Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán támogatásáért és a kísérletek megvalósításában, valamint az eredmények értékelésében nyújtott segítségéért.

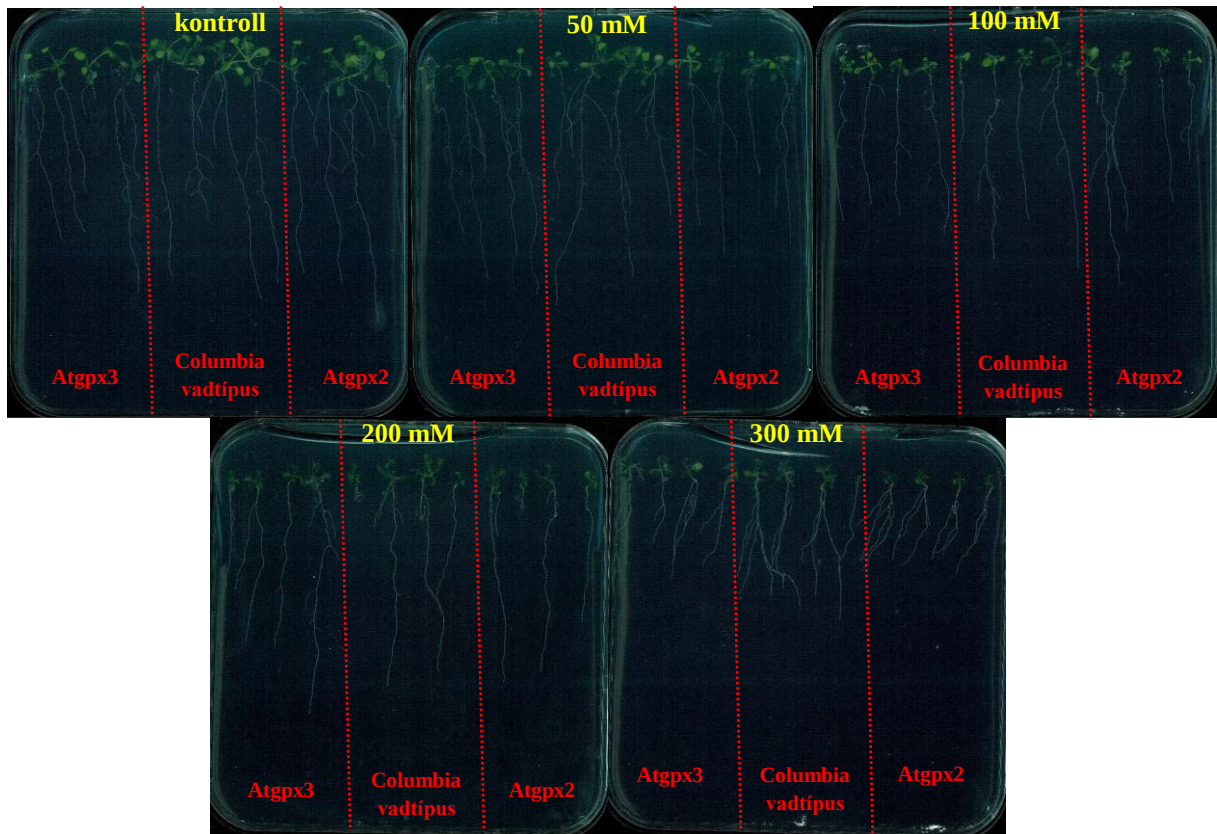
Köszönettel tartozom Dr. Gallé Ágnesnek, Dr. Szepesi Ágnesnek, Brunner Szilviának és Horváth Editnek a módszerek elsajátításában és a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönetet szeretnék mondani a Növénybiológiai Tanszék dolgozóinak, Ádámné Meszlényi Máriának, Kapásné Török Évának, Porkoláb Erzsébetnek - és mindenkinek, akit név szerint nem említettem meg - akik a mintavételezés során pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

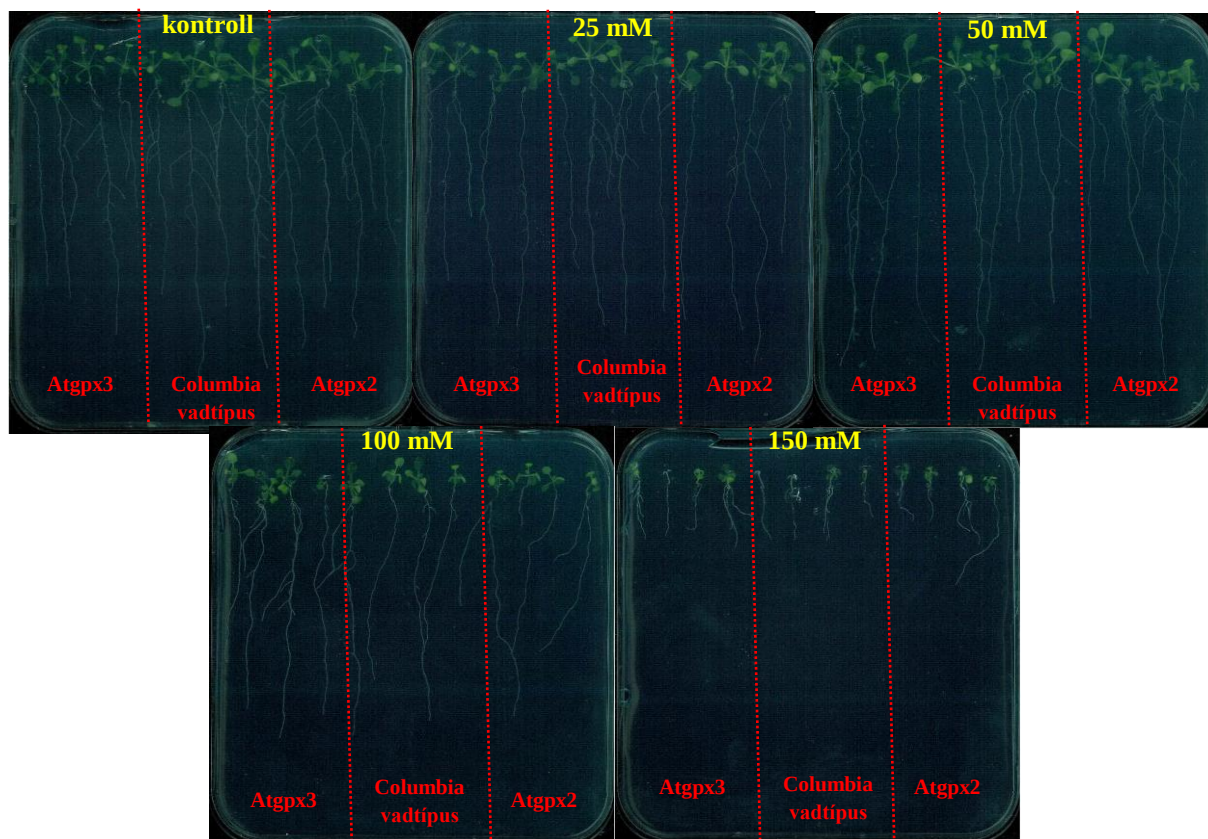
Köszönöm az MTA-SZBK Növénybiológiai Intézet Arabidopsis Molekuláris Genetika Csoport vezetőjének, Dr. Szabados Lászlónak, hogy helyet biztosított a növények neveléséhez, valamint köszönöm Dr. Zsigmond Laurának a magok beszerzésében illetve a kísérletek értékelésénél nyújtott segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akikre mindig számíthatok.

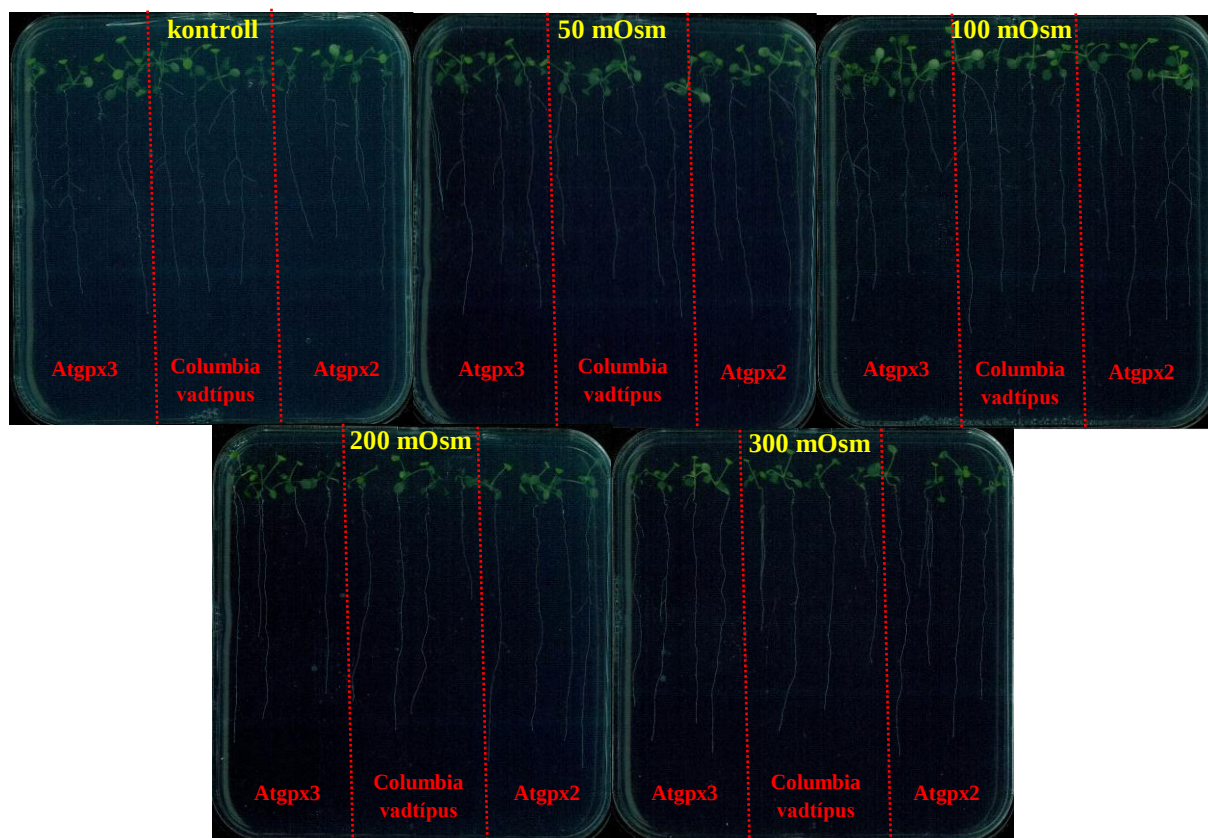
10. Függelék



4. kép Mannitollal kezelt 19 napos *Arabidopsis* csíranövények



5. kép NaCl-dal kezelt 19 napos *Arabidopsis* csíranövények



6. kép Polietilén glikollal kezelt 19 napos *Arabidopsis* csíranövények

11. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott *Bela Krisztina*, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biológus MSc szakjának nappali tagozatos hallgatója, kijelentem, hogy a dolgozatomban foglaltak saját eredményeim, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, módszerek, eszközök stb.) használtam fel. A leírt kísérleteket a módszerek elsajátítása után témavezetőm és a Növénybiológiai Tanszék munkatársainak felügyelete mellett önállóan kiviteleztem, jelentős segítséget a mintavételezés, homogenizálás során kaptam a tanszéki munkatársaktól. Az eredmények kiértékelését - témavezetői irányítás mellett - önállóan végeztem.

aláírás

2012. november 05.