

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék
Biológus MSc

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A poliamin katabolizmussal kapcsolt hidrogén-peroxid és
nitrogén-monoxid szerepe a só-stressz indukálta sejthalál
kiváltásában paradicsom növényekben**

Takács Zoltán

MSc. II. évfolyamos biológus szakos hallgató

Témavezetők: Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma, tanszékvezető egyetemi
docens

Dr. Szepesi Ágnes, egyetemi tanársegéd
SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék



Szeged
2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETŐ ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
I.1. A só-stressz és a programozott sejthalál	5
I.2. A poliaminok és szerepük a só-stresszre adott válaszokban	5
I.3. A poliaminok katabolizmusa	7
I.4. A poliamin-oxidáz gátlásának mechanizmusa	10
I.5. A poliaminok és a reaktív oxigénformák (ROS) kapcsolata	11
I.6. A poliaminok és a nitrogén-monoxid (NO) kölcsönhatása	12
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	14
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
III. 1. A növények nevelési paraméterei.....	15
III. 2. Alkalmazott kezelések	15
III. 3. Alkalmazott módszerek	15
III. 3. 1. Az életképesség meghatározása ionkieresztés alapján	15
III. 3. 2. A szabad poliaminok analízise HPLC-vel.....	16
III. 3. 3. A poliamin katabolizmusban szerepet játszó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO, EC 1.4.3.6), valamint a poliamin-oxidáz (PAO; EC 1.5.3.11) aktivitásának meghatározása	16
III. 3. 4. A diamin-oxidázt, valamint a poliamin-oxidázt kódoló gének expressziós vizsgálata	17
III. 3. 5. A H ₂ O ₂ tartalom kvantitatív meghatározása	18
III. 3. 6. Intracelluláris ROS és NO <i>in situ</i> detektálása.....	18
III. 4. Statisztikai analízis	18
IV. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....	19
IV. 1. Rövid ideig tartó sókezelés hatása a paradicsom növények ionkieresztésére az idő függvényében	19
IV. 2. A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl hatására fiatal hajtásban az idő függvényében	20
IV. 3. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; a poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H ₂ O ₂) mennyiségének változása fiatal hajtásban az idő függvényében	21
IV. 4. A lebontást végző enzimek (DAO, PAO) relatív transzkript szintjének változása fiatal hajtásban az idő függvényében.....	23
IV. 5. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében	24
IV. 6. A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelésnek kitett paradicsom növények gyökerében az idő függvényében.....	24
IV. 7. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H ₂ O ₂) mennyiségének változása gyökérben az idő függvényében	26
IV. 8. A lebontást végző enzimek (DAO, PAO) relatív transzkript szintjének változása gyökérben az idő függvényében	27
IV. 9. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében	28

IV. 10. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása fiatal hajtásban egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására	30
IV. 11. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása fiatal hajtásban egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására	31
IV. 12. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása gyökérben egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására....	32
IV. 13. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása gyökérben egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására	34
V. KÖVETKEZTETÉSEK	35
VI. IRODALOMJEGYZÉK	38
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	43
VIII. NYILATKOZAT.....	44

Rövidítések jegyzéke

ABS	abszcizinsav
CAD	kadaverin
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein
DAO	diamin-oxidáz (EC 1.4.3.6)
DAP	1,3-diaminopropán
DEP	dietil-pirokarbonát
Fms1	nem specifikus poliamin-oxidáz, (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (EC 1.5.3.17)
H ₂ DC-FDA	2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetát
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HPLC	„ <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography vagy <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography”, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HR	hiperszenzitív reakció
MDL72527	[N1,N4-bisz(2,3-butadienil)-1,4-butándiamin]
MES	2-(N-morfolin)-etánszulfonsav
NH ₃	ammónia
NR	nitrát-reduktáz
NO	nitrogén-monoxid
O ₂ ⁻	szuperoxid gyökanion
PAO	poliamin-oxidáz (EC 1.5.3.14)
PCD	„ <u>P</u> rogrammed <u>C</u> ell- <u>D</u> eath”, programozott sejthalál
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PUT	putreszcin
ROS	„ <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies” reaktív oxigénformák
SMO	spermin-oxidáz, állati (EC 1.5.3.16)
SNP	nátrium-nitroprusszid
SPD	spermidin
SPM	spermin
SOD	szuperoxid-dizmutáz (EC. 1.15.1.1)
TCA	triklórecetsav
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol
ZmPAO	kukorica poliamin-oxidáz, (<i>Zea mays</i>) (EC 1.5.3.11)

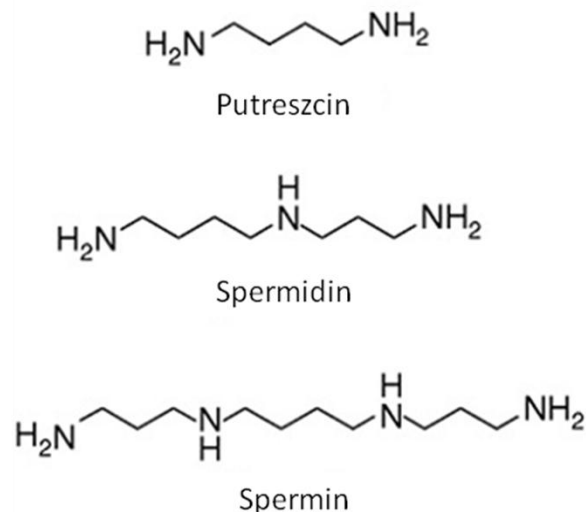
I. Bevezető és irodalmi áttekintés

I.1. A só-stressz és a programozott sejthalál

A só-stressz egy komplex környezeti tényező, ami két fő komponensből épül fel: egy ozmotikus komponensből, a talajoldat külső ozmotikus potenciáljának csökkenése miatt, és egy ionos komponensből (főleg a Na^+ és Cl^- ionok akkumulációja), amelyek toxikussá válhatnak magas sókoncentrációk esetén. A só-stressz nem specifikus hatásaként oxidatív stressz lép fel, amely során reaktív oxigénformák (ROS) keletkeznek. A membránokat, nukleinsavakat, fehérjéket degradáló és inaktíváló ROS eltávolítása a sikeres akklimatizáció egyik legfontosabb feltétele. A membránlipidek peroxidációját, a proteinek oxidációját, az enzimgátlást, valamint a DNS és az RNS károsodását okozó, a kioltó mechanizmusokat túllépő oxidatív stressz programozott sejthalálhoz (PCD) vezet (De Pinto és mtsai, 2012). A só-stressz egyik közvetlen hatása a gyökér merisztematikus régiójában a sejtek elhalása. *Arabidopsis thaliana* növények gyökércsúcsában a só-stressz programozott sejthalált okozott (Huh és mtsai, 2002). Só-stressz hatására fitohormonszerű alifás aminok (poliaminok) akkumulálódnak a növényekben, amelyek kapcsolatban állnak számos fiziológiai vagy élettani folyamattal, többek között a só-stresszre adott válaszokkal (Szepesi és mtsai, 2009; Gill és Tuteja, 2010; Gémes és mtsai, 2011).

I.2. A poliaminok és szerepük a só-stresszre adott válaszokban

A poliaminok kis molekulatömegű biológiailag aktív molekulák, amelyeknek szerepük van a növekedésben és a differenciálódásban (Bagni és Tassoni, 2001; Thomas és Thomas, 2003; Wallace és mtsai, 2003). A növényekben a legnagyobb mennyiségben előforduló poliaminok a diamin putreszcin (Put), amely obligát prekursora a triamin spermidinnek (Spd) és a tetramin sperminnek (Spm) (Cohen, 1998) (**1. ábra**). A növényekben a három fő poliaminon kívül egyéb di- és poliaminok is megtalálhatóak, mint például a diaminok közül az 1,3-diaminopropán (DAP), valamint a kadaverin (Cad).



1. ábra. A növényekben előforduló három legfontosabb poliamin: a diamin putreszcín, a triamin spermidin és a tetramin spermin vonalképlete

(Hideo Yamasaki és mtsai, 2006 alapján módosítva)

A poliaminok fiziológiai pH-n pozitív töltéssel rendelkeznek, ami lehetővé teszi, hogy kölcsönhatásba lépjenek és védelmet biztosítsanak olyan negatív töltésű makromolekuláknak, mint a DNS, RNS, fehérjék és foszfolipidek, így módon részt vesznek a membránok fizikai és kémiai tulajdonságainak, a nukleinsavak szerkezetének és az enzimek aktivitásának szabályozásában (Liu és mtsai, 2007). Továbbá kölcsönhatásba léphetnek antibiotikumokkal, fenolos vegyületekkel, leginkább a hidroxifahéjsavval (Martin-Tanguy, 2008). Ez alapján három formájukat különíthetjük el: a szabad szolubilis, a makromolekulákhoz kötött (például hemicellulóz, lignin), illetve kis molekulatömegű fehérjékhez konjugált formákat.

Növényekben a poliaminok sok fiziológiai és fejlődési folyamat szabályozásában vesznek részt, mint a növekedés, sejtosztódás, DNS replikáció, sejt differenciáció, organogenezis, embriogenezis, virágindíció és fejlődés, levélöregedés, abiotikus és biotikus növényi stresszválaszok (Wimalasekera és mtsai, 2011).

A poliaminoknak esszenciális szerepük van a sejt túlélésében, mivel a kémiai vagy genetikailag indukált Put és/vagy Spd szintek hiánya letálisnak bizonyult élesztőben, egysejtűekben és növényekben (Urano és mtsai, 2005). A Spm hiányos organizmusok életképesek, de különböző mértékű rendellenességeket mutatnak. Ez azt jelzi, hogy bár a Spm nem esszenciális, mégis nagyon fontos szerepet játszik a fejlődésben és a növekedésben (Yamaguchi és mtsai, 2007; Minguet és mtsai, 2008).

Az abiotikus stresszorok által aktivált ROS kioltásával a poliaminok növelik a sejtek életképességét és hozzájárulnak a sikeres akklimatizációhoz. A Spm fokozza a növények sótoleranciáját azáltal, hogy szabályozza a Ca^{2+} homeosztázist (Yamaguchi és mtsai, 2006; Kusano és mtsai, 2007), azonban a Spm sejten belüli koncentrációja a spermidinhez és a putreszcinhez képest meglehetősen alacsony. Zapata és mtsai. (2004) megvizsgálták néhány só-stressznek (100 mM vagy 150 mM NaCl) kitett növényfaj (spenót, saláta, dinnye, paprika, brokkoli, cékla és paradicsom) poliamin tartalmát. A cékla kivételével a Put koncentrációja alacsonyabb volt a sókezelt növényekben, tehát a só-stressz szignifikáns emelkedést okozott a Spd és a Spm szintekben majdnem az összes tanulmányozott növényfajban. Szepesi és mtsai. (2009) hosszú távú 1 hetes 100 mM NaCl kezelésnek kitett paradicsom növények fiatal hajtásában és gyökerében megvizsgálták a szabad poliamin tartalmak változását. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a kezelés során a Put koncentrációja alacsonyabb volt fiatal hajtásban és gyökérben, míg a Spd és Spm mennyisége nőtt a kezelés időtartama alatt. Ebből arra következtethetünk, hogy a „Put-pool” a Spd és Spm szintézisére használódhatott fel. A (Spd+Spm)/Put arány só-stressz hatására emelkedett, ami egybehangzó azzal a ténnyel, hogy a spermidinnek és a sperminnek tolerancia fokozó szerepe van a só-stresszel szemben (Mansour és Al-Mutawa, 1999) (**4. ábra**).

A sejt túlélését vagy halálát nemcsak a poliaminok mennyisége, hanem a lebontást végző enzimek (DAO és PAO) aktivitása, valamint az általuk katalizált reakciótermékek mennyisége is befolyásolja. A poliaminok ugyanis könnyen képesek kijutni az apoplasztba (stressz hatására vagy a hiperszenzitív reakció (HR) során), ahol degradációjuk következtében melléktermékként olyan fontos szignálmolekula keletkezhet, mint a hidrogén-peroxid (H_2O_2).

I.3. A poliaminok katabolizmusa

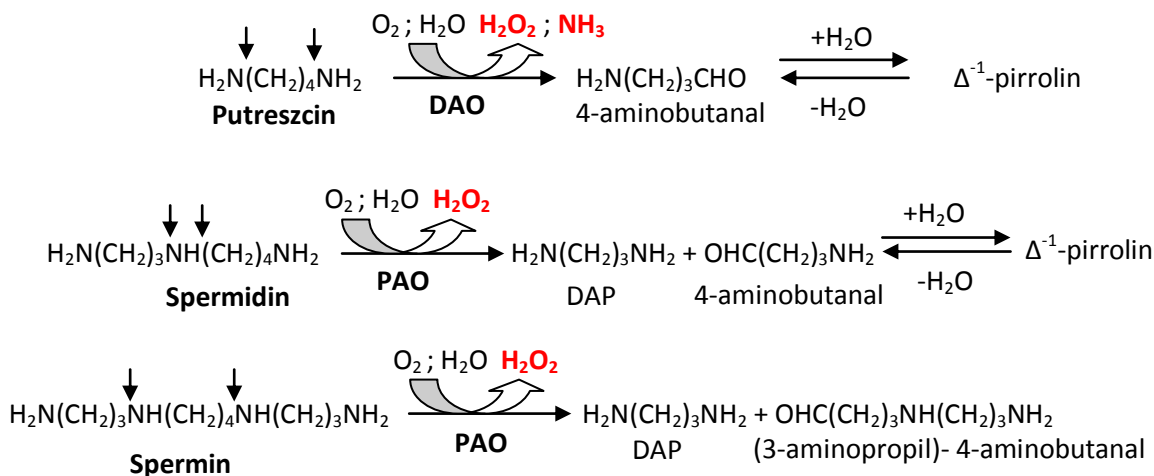
A sejten belüli poliamin koncentráció függ a poliamin bioszintézistől, a lebontásban szerepet játszó fehérjék génjeinek transzkripciójától és transzlációjától, továbbá a vakuoláris és extracelluláris transzportjuktól, illetve fenolos származékokkal történő konjugációjuktól (Wallace és mtsai, 2003).

A poliamin katabolizmusban szerepet játszó két apoplasztikus enzim, a réz tartalmú diamin-oxidáz (DAO, EC 1.4.3.6), mely a diamin putreszcin lebontását végzi, valamint a

FAD tartalmú poliamin-oxidáz (PAO, EC 1.5.3.14), mely a Spd és Spm katabolizmusát látja el.

Arabidopsis thaliana-ban 12 DAO-szerű gént találtak, de ebből csak egyet, az *ATAO1*-et jellemezték ez idáig (Alcazar és mtsai, 2006). A DAO enzim a putreszcint a primer aminocsoportjánál oxidálja, ezáltal 4-aminobutanallá alakítja, amely tovább alakulhat Δ^1 -pirrolinná. Melléktermékként ammónia (NH_3) és H_2O_2 keletkezik (2. ábra).

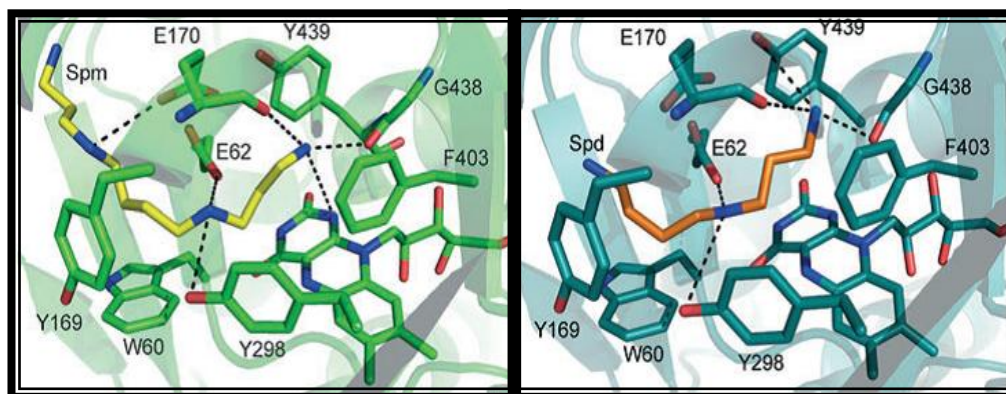
A PAO enzim által létrehozott termékek kémiai minősége függ attól, hogy az enzim milyen élőlényből származik. A növényi és a bakteriális PAO, a Spd és Spm N5 pozíciójú nitrogénjének *endo* oldalán található szénatomot oxidálja (Cona és mtsai, 2006), mely során 4-aminobutanal, vagy (3-aminopropil)-4-aminobutanal, illetve 1,3-diaminopropán keletkezik, és melléktermékként H_2O_2 szabadul fel (Wu és mtsai, 2003; Cona és mtsai, 2006) (2. ábra). Ellenben az állati szervezetekben megtalálható spermin-oxidáz (SMO) és az élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) előforduló nem specifikus poliamin-oxidáz (Fms1) a Spd és Spm (és/vagy acetilált származékait) az N5 pozíciójú nitrogén *exo* oldalán található szénatomon oxidálja (Landry és Stemglanz, 2003; Vujcic és mtsai, 2003; Wu és mtsai, 2003).



2. ábra: A putreszcín, spermidin, spermin katabolizmusa (Kuznetsov és Shevyakova, 2007 alapján módosítva)

A PAO enzimosztálynak a legjobban tanulmányozott képviselője a kukoricából kinyert PAO (ZmPAO) enzim. Ez egy 53 kDa nagyságú monomer glikoprotein, mely főleg az apoplaztban fordul elő (Šebela és mtsai, 2001). Jellegzetes tulajdonsága, hogy tartalmaz egy 30-Å hosszú U alakú katalitikus csatornát, amely legbelső része a flavin-izoxaloxazin gyűrű előtt van, így alakítva ki a katalitikus centrumot. A ZmPAO-Spm,

valamint a ZmPAO-Spd komplex komputeres modellezése során kiderítették, hogy az enzim két glutaminsav oldallánca (E170 és az E62) hidrogénkötéseket alakít ki a Spm és a Spd aminosocsoportjaival. Ennek a két aminosav oldalláncnak kulcsfontosságú szerepe van a szubsztrátkötésben (3. ábra).



3. ábra: A ZmPAO enzim aktív centruma, valamint a szubsztrátok (Spm és Spd) közötti kölcsönhatása

A pontozott vonalak mutatják a szubsztrát, valamint a fehérje közötti hidrogénkötéseket (Fiorillo és mtsai, 2011)

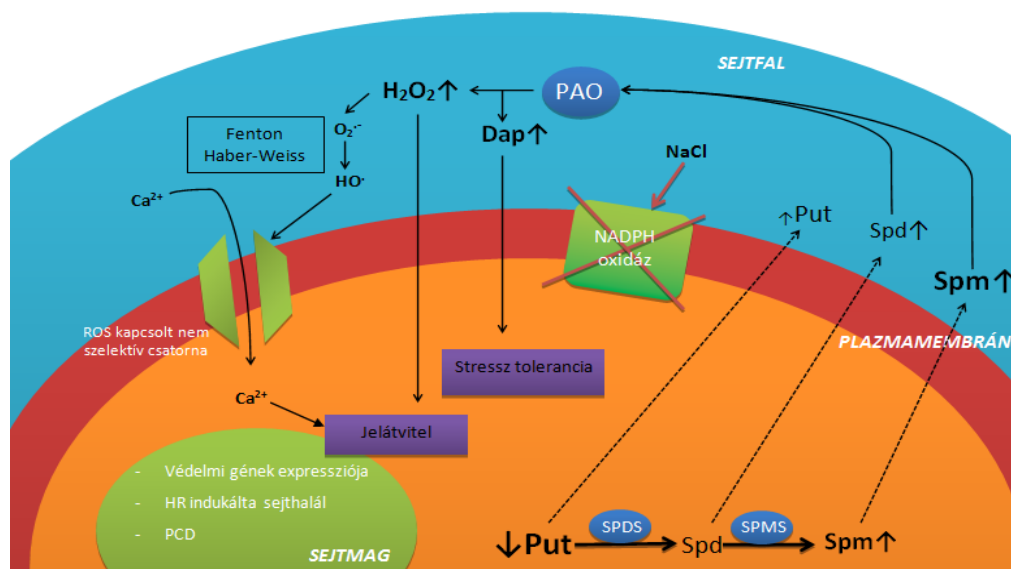
Az extracelluláris lokalizációjú ZmPAO enzimmal ellentétben az árpából kivont PAO (BPAO2) szimplasztikus lokalizációt mutat. Ezek a PAO enzimek egy nyolc aminosavból álló szekvenciát tartalmaznak a C terminális doménen, amely segítségével a vakuólumba transzportálódhatnak (Cervelli és mtsai, 2004).

Az állati SMO csak úgy, mint az élesztő Fms1 a poliaminok visszaalakításában (backconversion) vesz részt, amely során a spermin spermidinné, a spermidin pedig putreszcinné alakul (Seiler, 2004). *Arabidopsis* genomban 5 PAO enzimet kódoló gént találtak. Az AtPAO1, AtPAO3 és AtPAO4 szubsztrátspecifitásban és a katalizált reakciót tekintve is az állati SMO enzimekhez hasonlít (Tavladoraki és mtsai, 2006; Moschou és mtsai, 2008b). Az emlősök visszaalakítást végző PAO enzimei konstitutív módon expresszálódnak. Az AtPAO3 is konstitutív expressziót mutat, míg az AtPAO1 alacsony szinten expresszálódik növényekben (Tavladoraki és mtsai, 2006; Moschou és mtsai, 2008b). Az endogén PAO transzkriptum szintek szabályozása dohányban (Paschalidis, 2005) és kukorica mezokotilban auxin által szupresszált, míg a fény upregulálja a PAO expressziót (Cona és mtsai, 2003).

Yoda és mtsai. (2006) kimutatták, hogy a lebontást végző enzimek közül a PAO enzim az egyik kulcs eleme az oxidatív robbanásnak, ami PCD-t indukál dohány

sejtkultúrákban. A meglehetősen magas ZmPAO enzim aktivitás a differenciálódó trachea elemekben megerősíti azt az elképzelést, hogy a PAO enzimeknek közvetlenül szerepük van a PCD-ban (Cona és mtsai, 2006). Moschou és mtsai. (2008a) megvizsgálták, hogy só-stressz hatására a Spd az apoplasztba szekretálódott, ahol a PAO enzim lebontó működése révén, melléktermékként H_2O_2 keletkezett. Só-stressz alatt az apoplasztikus H_2O_2 és szuperoxid-gyökion ($O_2^{\cdot-}$) mennyisége nagyban függ a PAO enzim aktivitásától. A só ugyanakkor képes gátolni a plazmamembrán lokalizált NADPH-oxidáz enzim működését, ezáltal pedig csökkenteni az apoplasztikus $O_2^{\cdot-}$ mennyiségét (Rodriguez és mtsai, 2009) (4. ábra). Magas PAO enzim aktivitás magas H_2O_2 akkumulációt eredményezett az apoplasztban, amely elégséges volt a ROS által indukált PCD kiváltásához, míg egy közepes PAO és H_2O_2 szint a szignalizációs és védelmi gének expresszióját eredményezte, elősegítve az abiotikus stresszel szembeni toleranciát (Moschou és mtsai, 2008a).

Só-stressz hatása a poliaminokra növényi sejtekben

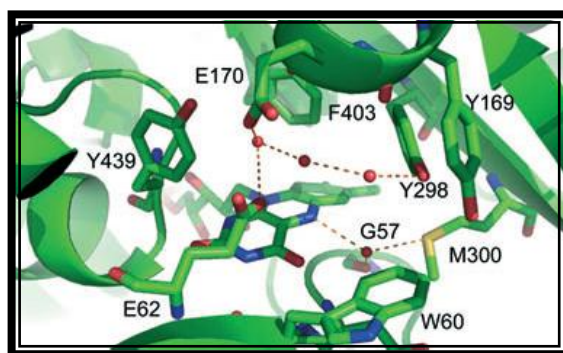


4. ábra: Apoplasztikus ROS generálásának és azok hatásának sematikus ábrázolása kukorica levélben só-stressz hatására (SPDS: spermidin-szintáz; SPMS: spermin-szintáz; PAO: poliamin-oxidáz; DAP: 1,3-diaminopropán; Rodriguez és mtsai, 2009 alapján módosítva)

I.4. A poliamin-oxidáz gátlásának mechanizmusa

A PAO enzim aktivitása az MDL72527 [N1,N4-bisz(2,3-butadienil)-1,4-butándiamin] nevű vegyülettel specifikusan gátolható. Az inhibitor irreverzibilis módon gátolja a ZmPAO enzim működését. Az MDL72527 inhibitor megakadályozza a szubsztrát

Spm, Spd PAO enzim E170 és E62 glutaminsav oldalláncaihoz való kötődését azáltal, hogy az enzim F403 és Y439 aminosav oldalláncaival létesít kapcsolatot, ezáltal fizikai úton gátolva a Spm és Spd bekötődését (Binda és mtsai, 1999) (**5. ábra**). Állati sejtekben, valamint a kísérleti állatok minden szervében mikromoláris koncentrációban képes volt gátolni az enzim működését anélkül, hogy a poliamin metabolizmus más enzimeit gátolná. Alkalmazása egér hosszú távú kezelésében halált okozott, mert a Spm a vörösvértestekben és a vérplazmában felhalmozódott. Ennek következtében a poliamin katabolizmus gátlása, különösképpen a Spm felhalmozódása végzetes ezekben az állatokban (Seiler és mtsai, 2002).



5. ábra: A ZmPAO szubsztrátkötésében résztvevő glutaminsav oldalláncok (E170 és E62), valamint a specifikus gátlószer az MDL72527 kötési helye az enzim tirozin (Y439) és fenilalanin (F403) aminosav oldalláncaihoz (Fiorillo és mtsai, 2011)

I.5. A poliaminok és a reaktív oxigénformák (ROS) kapcsolata

Az elmúlt években a poliaminok antioxidáns szerepét is megvizsgálták, hiszen közvetett módon képesek a ROS kioltására, illetve hatással vannak bizonyos antioxidáns enzimek aktivitására (Tang és Newton, 2005; Verma és Mishra, 2005). A poliaminok antioxidáns hatása az anionkötési képességükre vezethető vissza. Ebből a szempontból a kötött formák bizonyultak hatékonyabbnak (Bakhanashvili és mtsai, 2005; Groppa és Benavides, 2008). Chilling során a Put képes volt antioxidáns enzimekhez kötődni, például a szuperoxid-dizmutázhoz (SOD) vagy kisebb antioxidáns molekulákkal konjugátumot képezni. A poliaminok csökkentették a lipidperoxidációt, és megőrizték a membránok integritását (Nadeau, 1987).

Reaktív oxigénformák keletkezhetnek a mitokondriumban és a kloroplasztisban, a mitokondriális, valamint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc során, a peroxiszómban,

plazmamembrán lokalizált NADPH-oxidáz által, továbbá peroxidázok, apoplasztikus lokalizációjú amin-oxidázok (DAO, PAO) és oxalát-oxidázok által (Martin-Tanguy J, 2001; Papadakis, 2005; Cona és mtsai, 2006; Ahmad és mtsai, 2008; Mittler és mtsai, 2011).

A reaktív oxigénformák közé tartozó H_2O_2 másodlagos jelátviteli molekula, mely képes belépni a stressz szignáltranszdukciós útvonalába, ami elősegítheti az antioxidáns védekezési válaszok aktivációját. Alacsony koncentrációban védelmi szignál molekulaként, magas koncentrációban citotoxikus prooxidáns ágensként viselkedik. A H_2O_2 változásokat idézhet elő a redox jelátvitelben, melynek következtében a sejt vagy osztódik, vagy elpusztul (Ha és mtsai, 1997; Hu és Pegg, 1997). A PAO által keletkezett H_2O_2 kiváltja a MAPK (Mitogén aktivált protein kinázok) aktivációját is (Kusano és mtsai, 2008). A Spd és a Spm gátolta a NADPH-oxidáz működését, ily módon pedig a $O_2^{\cdot -}$ keletkezését, a Put pedig kivédte a PAO által generált H_2O_2 által indukált PCD kialakulását szőlő protoplasztokban (Papadakis és mtsai, 2005).

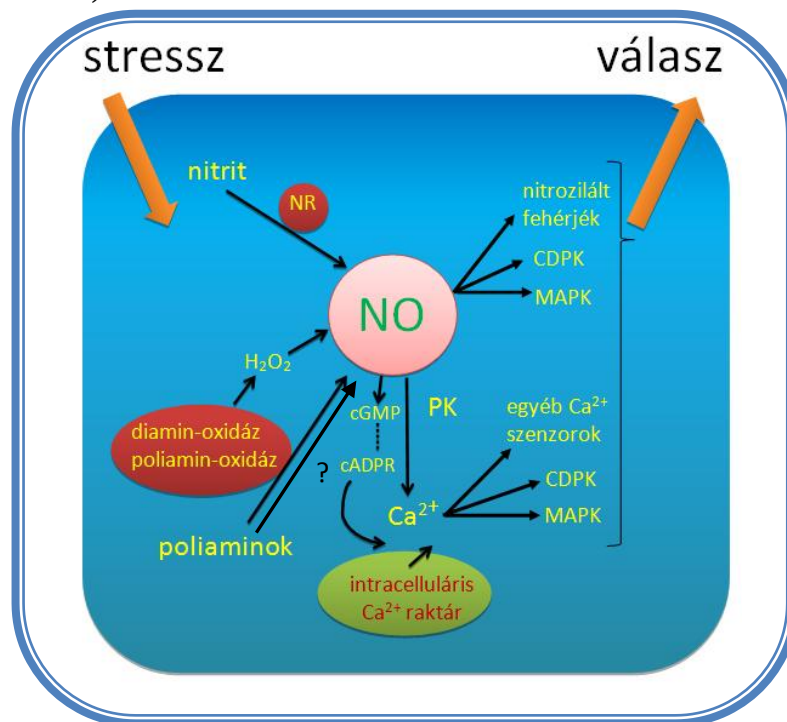
I.6. A poliaminok és a nitrogén-monoxid (NO) kölcsönhatása

A NO szintelen, gáz halmazállapotú, erőteljesen reaktív molekula, amely szignálmolekulaként kulcsszerepet játszik biotikus és abiotikus stresszválaszokban (Hung és mtsai, 2002). A differenciációban és fejlődésben betöltött szerepe hasonló a poliaminokéhoz. Részt vesz a magvak csírázásában (Sarath és mtsai, 2006), gyümölcsérésben (Manjunatha és mtsai, 2010), szeneszcenciában (Corpas és mtsai, 2004) és az abiotikus stressz (szárazság, hő- és magas só-stressz) során az adaptív válaszgének bekapcsolásában (Qiao és mtsai, 2008). Kulcsfontosságú intermedier molekula a citokinin (Tun és mtsai, 2008), abszcizinsav (Garcia-Mata és mtsai, 2002), etilén (Leshem és mtsai, 2000) és a poliamin (Tun és mtsai, 2006) szignalizációban. Közreműködik a PCD folyamatában (Neill és mtsai, 2003), ugyanis koncentrációtól függően lehet antioxidáns vagy citotoxikus hatású.

A poliaminok képesek hatni a NO képződésre (Yamasaki és Cohen, 2006), indukálják a NO termelődést, aminek fontos szerepe lehet a stresszválaszok és más stresszközvetítők közötti kapcsolat megteremtésében (Tun és mtsai, 2006). A Spd és a Spm gyors, néhány percen belüli NO képződést indukál *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcsok elongációs zónájában, valamint az alsó levelekben, különösképpen az erekben és a trichómákban (Tun és mtsai, 2006). Ugyanakkor a poliaminok képesek csökkenteni a nitrát

asszimilációt és valószínűleg a NO nitritből történő produkcióját is azáltal, hogy kölcsönhatásba lépnek egy 14-3-3 fehérjével (Rockel és mtsai, 2002; Athwal és Huber, 2002). A 14-3-3 fehérjéhez való kötődés következtében a nitrát-reduktáz (NR) inaktivációja következik be, amely a NO egyik forrása a növényi sejtekben.

A keletkezett NO számos úton képes kapcsolatba lépni a reaktív oxigénformákkal, és ezáltal a védekezési jelátvitelben játszhat szerepet só-stressz során (Poór és mtsai, 2012). Gémes és mtsai. (2011) kimutatták, hogy az exogén Spd és Spm növelte mind a NO mind pedig a ROS koncentrációját, ezáltal pedig csökkenti az életképességet paradicsom protoplaszt sejtekben. Ezzel szemben Fan és mtsai. (2010) kimutatták, hogy nátrium-nitroprusszid (SNP) hozzáadása után, amely egy NO donor, csökkent a szabad Put és Spd mennyisége, valamint a PAO enzim aktivitása só-stressz alatt uborka növényekben. Az SNP kezelés továbbá növelte a Spm mennyiségét, amely fokozta a növények sótoleranciáját. A NO hatása elősegítheti vagy gátolhatja a PCD-t a fehérjék S-nitrozilációján keresztül, amely nagyban függ számos faktortól többek között a sejt típusától, a celluláris redox állapottól, valamint a NO helyi koncentrációjától (Wang és mtsai, 2010) (6. ábra).



6. ábra: A nitrogén-monoxid (NO) jelátvitelének sematikus ábrázolása növényi sejtekben (cADPR: ciklikus ADP ribóz; CDPK: Ca^{2+} függő protein kináz; cGMP: ciklikus GMP; H_2O_2 : hidrogén-peroxid; MAPK: mitogén aktivált protein kináz; NR: nitrát-reduktáz; PK: protein kináz; Wimalasekera és mtsai, 2011 alapján módosítva)

II. Célkitűzések

Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a rövidtávú kezelésben alkalmazott alacsony (100 mM) és magas (250 mM) NaCl koncentráció milyen változásokat indukál a paradicsomnövények poliamin tartalmában, valamint a poliaminok katabolizmusában, és mindez miképp járul hozzá vagy hozzájárulhat-e a só-stresszel szembeni tolerancia kialakításához vagy ellenkező esetben a növényi egyedek pusztulásához az idő függvényében.

Munkánk során célunk volt annak megállapítása, hogy rövidtávon alacsony és magas sókoncentrációval kezelt paradicsom növények szabad poliamin mennyisége hogyan alakul, az azok lebontásában szereplő enzimek (DAO, PAO) aktivitása, valamint a reakciójuk melléktermékeként keletkezett H_2O_2 mennyisége korrelál-e ezekkel a változásokkal. A DAO és PAO enzimeket kódoló gének aktivitása hogyan változik az idő függvényében, valamint a lebontó enzimek aktivitása során keletkezett H_2O_2 szerepet játszik-e az intracelluláris összes ROS alakulásában. Mivel a poliaminok indukálhatják a NO bioszintézisét, amely szerepet játszhat a stressztolerancia vagy a sejthalál kiváltásában, ezért megvizsgáltuk a NO koncentráció alakulását gyökércsúcsokban az idő függvényében.

A PAO katabolizmus só-stresszben betöltött fontosságának tanulmányozására egy specifikus PAO gátlószert, az MDL72527 ([N1,N4-bisz(2,3-butadienil)-1,4-butándiamin]) vegyületet alkalmaztuk. Megvizsgáltuk idő függvényében a katabolikus enzimek aktivitásának változását, továbbá választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a poliaminok lebontó enzimei közül a PAO enzim aktivitásának gátlása hogyan befolyásolja a H_2O_2 , az összes ROS és a NO mennyiségét rövidtávon 100 mM és 250 mM NaCl koncentráció hatására.

III. Anyagok és módszerek

III.1. A növények nevelési paraméterei

A kísérletek során *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego paradicsom növényeket vizsgáltunk. A magokat három napig, sötétben csíráztattuk 27 °C-on. Csírázás után a növények kéthetes korukig perlitben nevelkedtek, majd hidropónikus körülmények között, tápoldatban fejlődtek háromhetes korukig (Poór és mtsai, 2011). A tápoldat a következő elemeket tartalmazta: ((2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , és mikroelemek (10^{-6} M MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-7}$ M ZnSO_4 , 10^{-7} M CuSO_4 , 10^{-7} M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10^{-5} M H_3BO_4 , $2 \cdot 10^{-5}$ M Fe-EDTA). A tápoldat pH-ja 5,8 volt. A tápoldatot hetente háromszor cseréltük. A növények a következő nevelési paraméterek mellett fejlődtek: 12 órás nappali, 12 órás éjszakai periódus, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 55-60%-os relatív páratartalom.

III. 2. Alkalmazott kezelések

A só-stressz kiváltására NaCl-t alkalmaztunk, amit a növények 3 hetes korukban 6 óráig kaptak. Két általunk kiválasztott, alacsony (100 mM) és magas (250 mM) só koncentrációkkal dolgoztunk.

A PAO enzim gátlására egy irreverzibilisen ható specifikus gátlószert, az MDL72527 ([N1,N4-bisz(2,3-butadienil)-1,4-butándiamin]) használtuk (Sigma-Aldrich). A gátlószerezrel történő kezelés a sókezelés előtt 10 perccel történt, 50 μM -os koncentrációban a tápoldathoz keverve.

A mintaszedések időpontjai a következők voltak: 0, 0,5, 1, 2, 3 és 6 h. Méréseinket a csúcstól számított második levélemeleten lévő, de már teljesen kifejlett leveleken (fiatal hajtás), valamint gyökereken végeztük.

III. 3. Alkalmazott módszerek

III. 3. 1. Az életképesség meghatározása ionkieresztés alapján

Az életképesség meghatározása Sun és mtsai. (2010) alapján történt. Kezelésenként 100 mg gyökeret vagy 1 cm átmérőjű levélkorongokat használtunk, melyeket 2 órára, 25 °C-ra, 15 ml ioncserélt desztillált vízbe helyeztünk. Az inkubáció után megmértük az oldat konduktivitását (C1) konduktivitásmérővel (OK-102/1 Radelkis, Budapest, Magyarország). Ezután a mintákat 40 percig 95 °C-ra felforraltuk, majd ismételtén meghatároztuk az oldat konduktivitását (C2). A relatív ionkieresztést (EL) az alábbi képlet alapján határoztuk meg: $EL(\%) = (C1/C2) \times 100$.

III. 3. 2. A szabad poliaminok analízise HPLC-vel

A poliaminokat Flores és Galston (1982) módszerével Tari és Csiszár (2003) által leírt protokoll szerint határoztuk meg. A növényi szöveteket 5%-os perklórsavban homogenizáltuk 0 °C-on. Centrifugálás után (4 °C, 20 perc, 6000 rpm), a felülúszót 2 ml 2 M NaOH-dal közömbösítettük. A poliaminokat benzoil-kloriddal származékká alakítottuk, majd a benzoil-poliaminokat 3 ml dietil-éterrel extraháltuk. A szerves fázist szárazra pároltuk. A benzoil-poliaminokat HPLC-n (JASCO HPLC System, Japán) reverz fázisú kolonnán (Apex octadecyl 5 μ ; 250x4,6 mm), acetonitril:víz 45:55 (v:v) elegyével választottuk el, és UV detektor segítségével 254 nm-en azonosítottuk.

III. 3. 3. A poliamin katabolizmusban szerepet játszó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO, EC 1.4.3.6), valamint a poliamin-oxidáz (PAO; EC 1.5.3.11) aktivitásának meghatározása

A DAO és PAO enzimek aktivitásait spektrofotometriásan határoztuk meg. A módszer a Δ^1 -pirrolin kolorimetriás meghatározásán alapszik. A DAO enzimaktivitás meghatározásához szubsztrátként Put-t, a PAO enzimaktivitás méréséhez Spd-t használtunk (Holmstead és mtsai, 1961). A növényi mintákat folyékony nitrogénben porítottuk, majd extrakciós puffert mértünk rá. Az extrakciós puffer összetétele: 1 M Tris pH=8.0, 50 % glicerol, 20 % Triton-X 100, 100 mM PMSF, 1 mM leupeptin. Az extraktumot 12000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz foszfát puffert és 1 M Put-t, ill. Spd-t adtunk, majd 37 °C-on 1,5 óráig inkubáltuk. Inkubáció után 20 %-os TCA-t és 10 mg/ml 2-amino-benzaldehidet adtunk a mintákhoz. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 12000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A Δ^1 -pirrolin termék keletkezését 430 nm-en az abszorbancia leolvasásával detektáltuk (Moschu és mtsai, 2008a).

III. 3. 4. A diamin-oxidázt, valamint a poliamin-oxidázt kódoló gének expressziós vizsgálata

A növényi összes RNS kinyeréséhez körülbelül 100 mg mintát folyékony nitrogénben dörzscsészében elporítottunk, majd 1 ml TRI reagenst adtunk hozzá (1,822 M guanidium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát pH 4,0, 0,7341 mM N-lauril-szarkozin, 44 mM β -merkaptóetanol, 45,45% fenol). A mintákat 65 °C-on 3 percig inkubáltuk, majd mintánként 200 μ l kloroformot adtunk hozzá. Centrifugálás után a felülúszókat átpipettáztuk egy új eppendorf csőbe, és 375 μ l kloroform:izoamilalkohol (24:1) elegyet adtunk hozzá. Újabb centrifugálás után a felülúszót 500 μ l izopropanolba pipettáztuk, majd szobahőmérsékleten állni hagytuk. Centrifugálás után a pelletet 500 μ l 70 %-os etanollal tisztítottuk, majd 30 μ l dietil-pirokarbonátot (DEP) tartalmazó steril desztillált vízben feloldottuk az RNS-t. Az esetleges degradációt agaróz gélelektroforézissel (1 %) ellenőriztük (Gallé Á, 2010).

A tisztított RNS mennyiségének meghatározása és DNáz kezelése (Gallé Á, 2010) után reverz transzkriptáz enzim hozzáadásával cDNS-sé írtuk át (Gallé Á, 2010).

A vizsgálni kívánt gének expresszióját kvantitatív real-time PCR segítségével detektáltuk. Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisból beazonosított dohány PAO génjével ortológ paradicsom szekvenciára (AK322530.1) és a paradicsom réztartalmú amin-oxidáz (DAO) szekvenciájára (AJ871578.1) a Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen és mtsai, 2000) segítségével primereket terveztünk (PAO: 5'-CCGTCAACTCCAAAAACACC-3', 5'-TCCTCTTTCATCAGCAACCA-3'; DAO: 5'-AATACGGGTTCGGGTACAA-3', 5'-TGCCACAAATACACCATCCATA-3'). Referencia génként a paradicsom elongációs faktor 1 alfa (EF1 α) génjét választottuk (5'-GGAAGTTGAGAAGGAGCCTAAG-3', 5'-CAACACCAACAGCAACAGTCT-3'). A tervezett primer szekvenciák génspecifitását az NCBI BLAST analízisével visszaellenőriztük. 15 ml szintetizált cDNS-t 285 ml nukleázmentes vízzel kihígítottunk, majd ebből 9 μ l hígított cDNS-t összekevertünk 0,5 μ l primerpárral és 10 μ l SYBERGreen mixxel. A qRT-PCR-t Real-Time PCR detektorral ellátott PCR készülékkel (Biorad, Hercules CA, USA) végeztük. A reakció 41 ciklusból álló sorozatból (95 °C 15 másodpercig, 60 °C 1 percig) állt. A SYBERGreen festék fluoreszcenciáját minden lépés után az Opticon Monitor szoftver (BioRad, Hercules CA, USA) segítségével detektáltuk. A PCR reakció után a termékek specifikusságát az olvadási görbék detektálásával ellenőriztük. Az adatok analízisekor a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk (Gallé Á, 2010).

III. 3. 5. A H₂O₂ tartalom kvantitatív meghatározása

A H₂O₂ tartalmakat Velikova (2000) módszere alapján határoztuk meg. A friss növényi anyagot (200 mg) 700 µl 0,1 %-os TCA-ban homogenizáltuk, majd centrifugálás után 0,5 ml felülúszóhoz hozzáadtunk 0,5 ml K-foszfát puffert (10 mM, pH=7,0) és 1 ml kálium-jodid (KI) (1 M) oldatot. Az oldatok optikai denzitását 390 nm-en mértük KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével 10 mM-os K-foszfát pufferrel szemben. A H₂O₂ tartalmakat kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg.

III. 3. 6. Intracelluláris ROS és NO in situ detektálása

Az intracelluláris összes ROS *in situ* detektálására egy erre alkalmas fluoreszcens festéket, a 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetátot (H₂DC-FDA) használtunk. A H₂DC-FDA az intracelluláris peroxinitrit aniont (ONOO⁻); hidroxil gyököt ([•]OH) és a hidrogén-peroxidot (H₂O₂) festi meg. A festés során a gyökereket 20 percig 10 mM MES-TRIS/KCl pufferben (pH 5.8) sötétben, 37 °C-on inkubáltuk 10 µM koncentrációjú H₂DC-FDA festék oldattal, majd egyszer mostuk 10 mM MES/TRIS/KCl pufferrel (pH 5.8) (Gémes és mtsai, 2011).

A NO felszabadulást 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein (DAF-FM DA) festékekkel mutattuk ki. A festés során a gyökereket 10 µM DAF-FM DA festékoldattal festettük 20 percig sötétben 10 mM MES-TRIS/KCl pufferben (pH 5.8) szobahőmérsékleten. Festés után egyszer mostuk a mintákat 10 mM MES-TRIS/KCl pufferrel (pH 5.8) (Kolbert és mtsai, 2012).

Az így előkészített mintákat ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss, Jéna, Németország) alatt vizsgáltuk. A felvételek készítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (Axiocam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A detektált fluoreszcencia intenzitásokat az AXIOVISION REL. 4.5. nevű szoftver (Carl Zeiss, München, Németország) segítségével értékeltük ki (Gerjesztés 450-495, emisszió 515-565 nm).

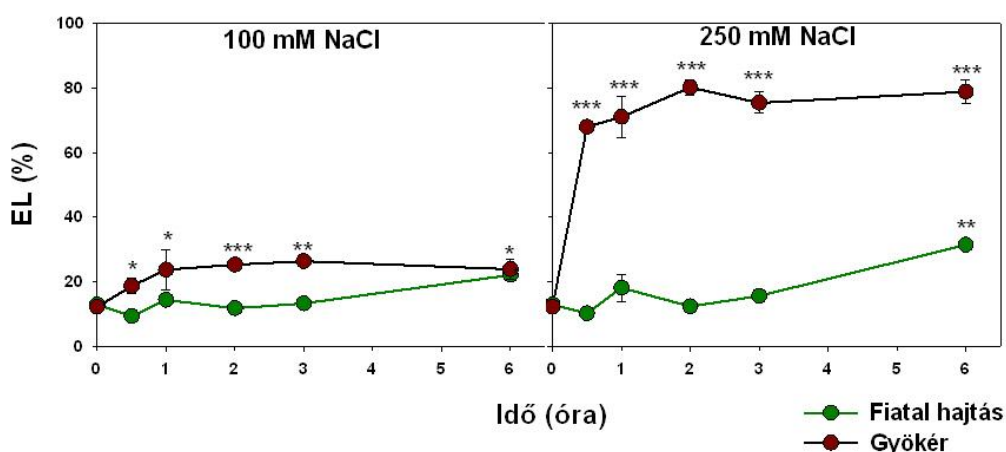
III. 4. Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok minden esetben három független biológiai ismétlés átlag-és szórásértékei. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket a Student-féle *t*-tesztrel állapítottuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken.

IV. Eredmények és kiértékelésük

IV. 1. Rövid ideig tartó sókezelés hatása a paradicsom növények ionkieresztésére az idő függvényében

A kísérlet során a paradicsom növényeket két általunk választott alacsony (100 mM), illetve magas (250 mM) NaCl koncentrációval kezeltük. Megvizsgáltuk mindkét koncentráció esetén fiatal hajtásban, valamint gyökérben a plazmamembrán szemipermeabilitásáról információt adó ionkieresztést. Amennyiben az ionkieresztés magas, a sejtek plazmamembránja károsodott, mely egy kezdeti lépése a sejt pusztulásának. Az ionkieresztés fiatal hajtásban 100 mM NaCl kezelés esetén alacsony volt, míg 250 mM NaCl koncentráció hatására 3 óra után folyamatos emelkedés tapasztalható. A 250 mM NaCl-dal kezelt növények gyökerében az ionkieresztés szignifikánsan megemelkedett már 0,5 órával a kezelést követően és egészen a kezelés végéig (6 h) magas is maradt, amely egybehangzó azzal a ténnyel, hogy 250 mM NaCl kezelés során szignifikánsan megnőtt a gyökerek elhalása. Ez a folyamat irreverzibilis plazmamembrán károsodásra utal, míg 100 mM NaCl-dal kezelt gyökerekben ez a változás reverzibilis, a kezelés végére kontrollhoz közeli értéket kaptunk (7. ábra).



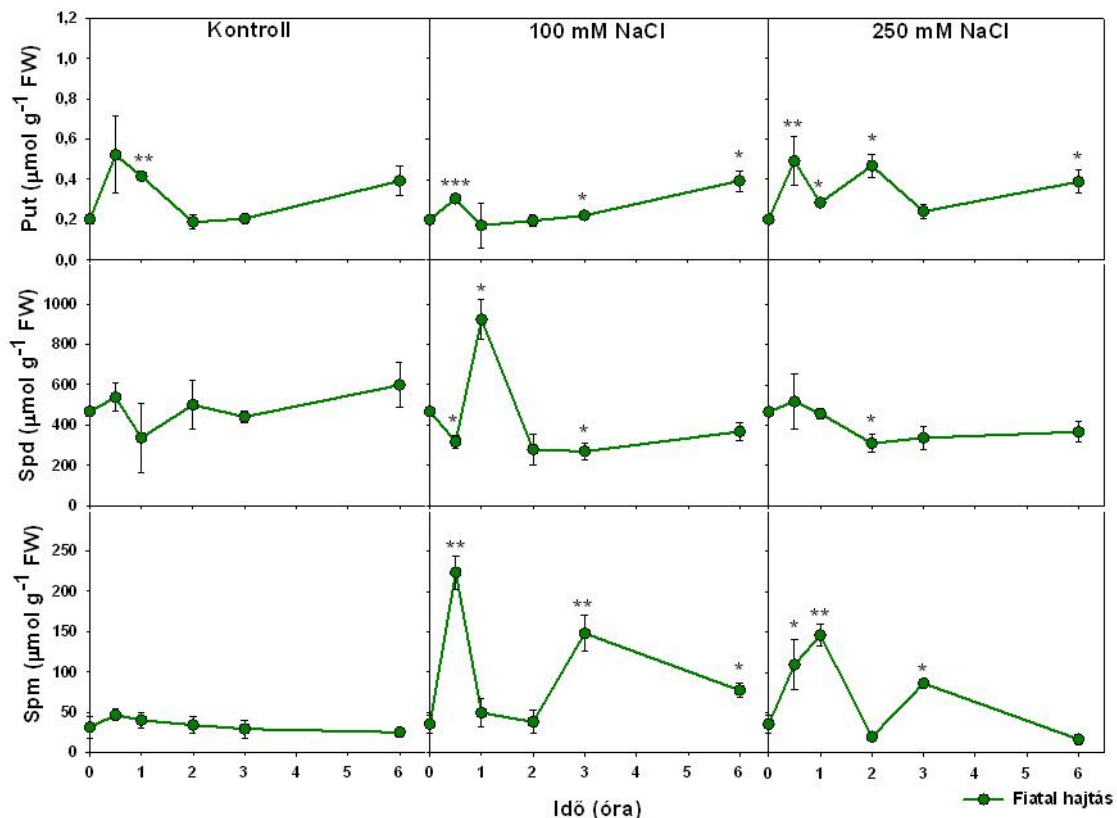
7. ábra: Az ionkieresztés változása rövid ideig tartó NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában és gyökerében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

IV. 2. A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl hatására fiatal hajtásban az idő függvényében

A poliaminok kis molekulatömegű polikationok, amelyek képesek megnövelni a sejtek túlélését, azonban túl magas koncentrációban citotoxikus prooxidánsként viselkedhetnek. A növényekben előforduló három fő, szabad poliamin a putreszcin (Put), spermidin (Spd), valamint a spermin (Spm) egymáshoz viszonyított sejten belüli aránya is döntő fontosságú a stresszel szembeni tolerancia vagy a programozott sejthalál (PCD) indukciójában.

Fiziológiai körülmények között fiatal hajtásban a Put és Spd sejten belüli koncentrációja a spermin mennyiségéhez képest magasabb volt. 100 mM NaCl kezelés hatására ez az arány eltolódott. A Put mennyisége a kontrollhoz képest lecsökkent, míg a Spd 1 óránál, a Spm mennyisége pedig 0,5 óránál és 3 óránál mutatott szignifikáns emelkedést. 250 mM NaCl kezelés hatására a Put mennyisége kismértékben lecsökkent a kontrollhoz képest, míg a 100 mM NaCl-dal kezelt növények Put mennyiségével összehasonlítva magasabb sejten belüli koncentrációt mutatott. A magasabb sókoncentrációval kezelt növények fiatal hajtásában a Spd és Spm mennyisége a 100 mM NaCl kezeléshez képest alacsonyabb volt, ugyanakkor a 250 mM NaCl-dal kezelt növények nem voltak képesek a kezelés végéig (6 h) megtartani a Spm mennyiségét.

A só-stressznek kitett növények sejten belüli Spm mennyisége döntő fontosságú az akklimatizáció szempontjából. A 100 mM NaCl-dal kezelt növények képesek voltak megtartani a Spm mennyiségét fiatal hajtásban, míg a 250 mM NaCl-dal kezelt növények Spm tartalma a kezelés végére lecsökkent, amely hozzájárulhatott a magas só-stressz által kiváltott PCD-hoz (**8. ábra**).



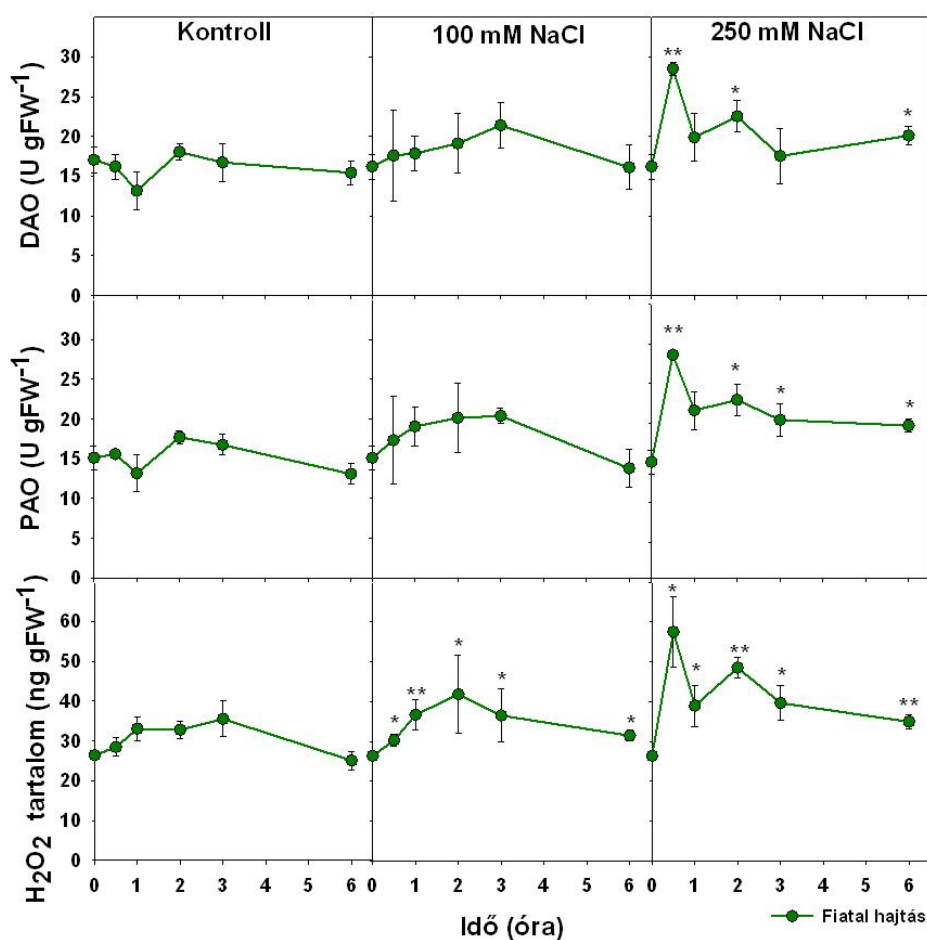
8. ábra: A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok±SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

IV. 3. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; a poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása fiatal hajtásban az idő függvényében

A poliamin katabolizmusban szerepet játszó diamin-oxidáz (DAO), illetve poliamin-oxidáz (PAO) enzimek aktivitása fontos szerepet játszik a poliaminok oxidációja során fellépő apoplasztikus oxidatív robbanás kialakításában azáltal, hogy a lebontó folyamatok során melléktermékként hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik, melynek mennyiségében bekövetkező változások hozzájárulhatnak a sótolerancia vagy a PCD kiváltásához.

A kontroll körülmények között mind a DAO, mind pedig a PAO enzimek aktivitása, valamint a H_2O_2 mennyisége csak kismértékben változott az idő függvényében.

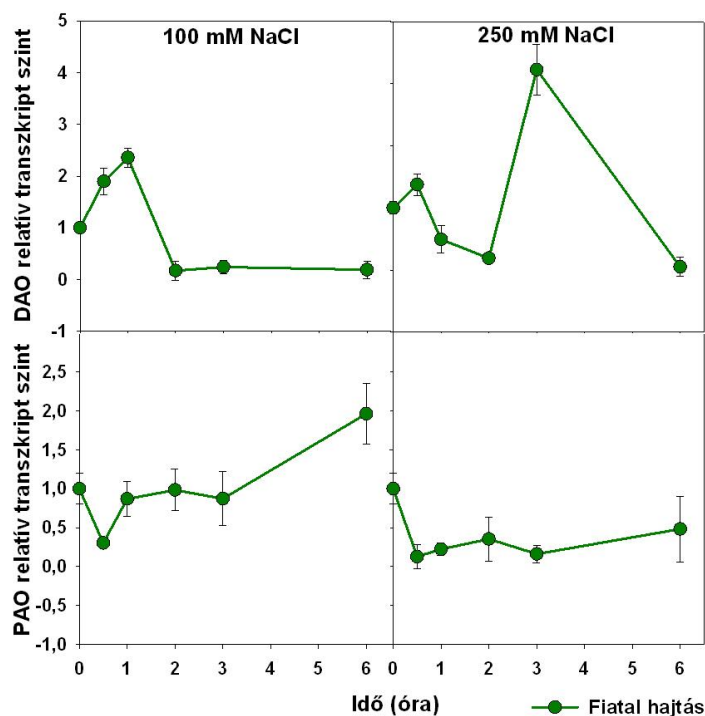
100 mM NaCl kezelés hatására a DAO és PAO enzimek aktivitása nem mutatott szignifikáns emelkedést a kontrollhoz képest ez az emelkedés pedig a H₂O₂ koncentrációjának időbeli változásában is megnyilvánult. 250 mM NaCl kezelés hatására a DAO, PAO enzimek aktivitás, valamint a H₂O₂ mennyisége kettős csúcsot mutatott a kezelést követő 0,5 és 2 óránál. Ez a kettős csúcs, valamint a kontrollhoz és a 100 mM NaCl-dal kezelt növényekhez képest a magas PAO és DAO enzimek aktivitása magas H₂O₂ akkumulációt eredményezett, amely elégséges lehetett a ROS indukálta PCD kiváltáshoz. 100 mM NaCl kezelés esetén közepes PAO, DAO enzimaktivitás, illetve az ezt kísérő közepes H₂O₂ mennyisége szignalizációs és védelmi gének expresszióját eredményezhette, amely elősegíthette a só-stresszel szembeni toleranciát (9. ábra).



9. ábra: A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; a poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14), valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H₂O₂) mennyisége 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok±SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (*P≤0.05; **P≤0.01, ***P≤0.001).

IV. 4. A lebontást végző enzimek (DAO, PAO) relatív transzkript szintjének változása fiatal hajtásban az idő függvényében

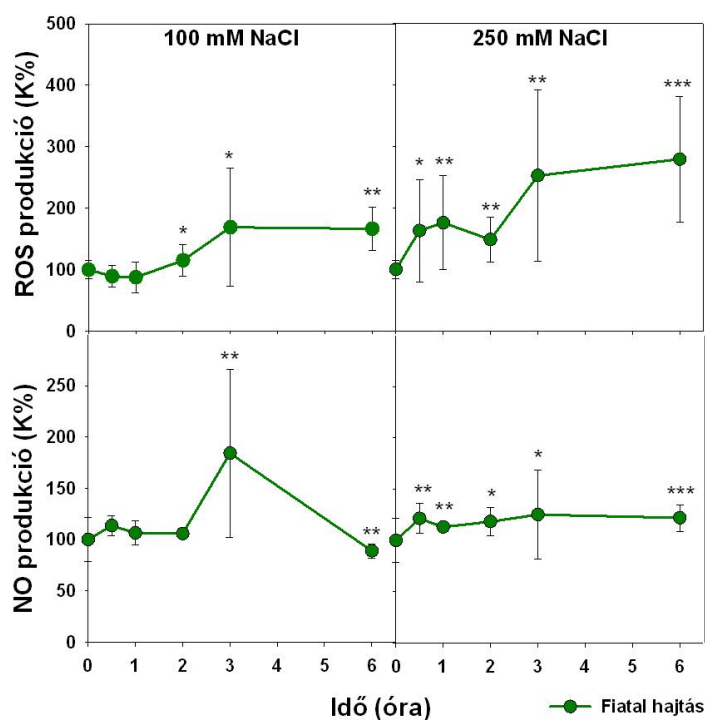
A DAO relatív transzkriptjének szintje fiatal hajtásban 100 mM NaCl kezelés hatására a kezelést követő 1 óráig emelkedett, majd hirtelen lecsökkent és a kezelés végéig alacsony is maradt. Az 1 órás emelkedés következtében nöhetett a DAO enzimaktivitása 3 óránál. 250 mM NaCl kezelés hatására a DAO transzkript szintje 3 óránál mutatott szignifikáns emelkedést, majd a kezelés végére lecsökkent. A PAO relatív transzkriptjének szintje a kezelést követő 0,5 órában lecsökkent, de a kezelés végére kontrollhoz közeli értéket mutatott, illetve kismértékben meg is emelkedett a 100 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények fiatal hajtásában. 250 mM NaCl-dal kezelt növények esetén a PAO transzkript szintje a 100 mM NaCl kezeléshez hasonlóan a kezelést követő 0,5 órában lecsökkent, de az alacsony koncentrációval kezelt növények fiatal hajtásával ellentétben ez a csökkenés a kezelés végéig megmaradt (10. ábra).



10. ábra: A DAO, PAO transzkript szint változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A transzkript szint relatív egysége a *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego kontroll mintáiban mért relatív transzkript szint (=1).

IV. 5. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében

A reaktív oxigénformák (ROS) azon belül is a H_2O_2 , valamint a nitrogén-monoxid (NO) fontos szerepet játszik, mint védelmi szignálmolekula, azonban magas koncentrációban citotoxikus prooxidáns ágensként viselkednek, amelynek következtében PCD indukálódhat. 100 mM NaCl kezelés hatására a ROS koncentrációja kismértékben emelkedett, de ez az emelkedés a 250 mM NaCl kezelt növények fiatal hajtásához képest kisebb mértékű volt. A NO koncentrációja 100 és 250 mM NaCl kezelés hatására 0,5 óránál kismértékű emelkedést mutatott, de míg ez az emelkedés a 100 mM NaCl-dal kezelt növényeknél a kezelés végére kontroll alá csökkent, addig a 250 mM NaCl kezelést kapott növények NO termelődése a kezelés végéig kontroll fölött maradt (**11. ábra**).

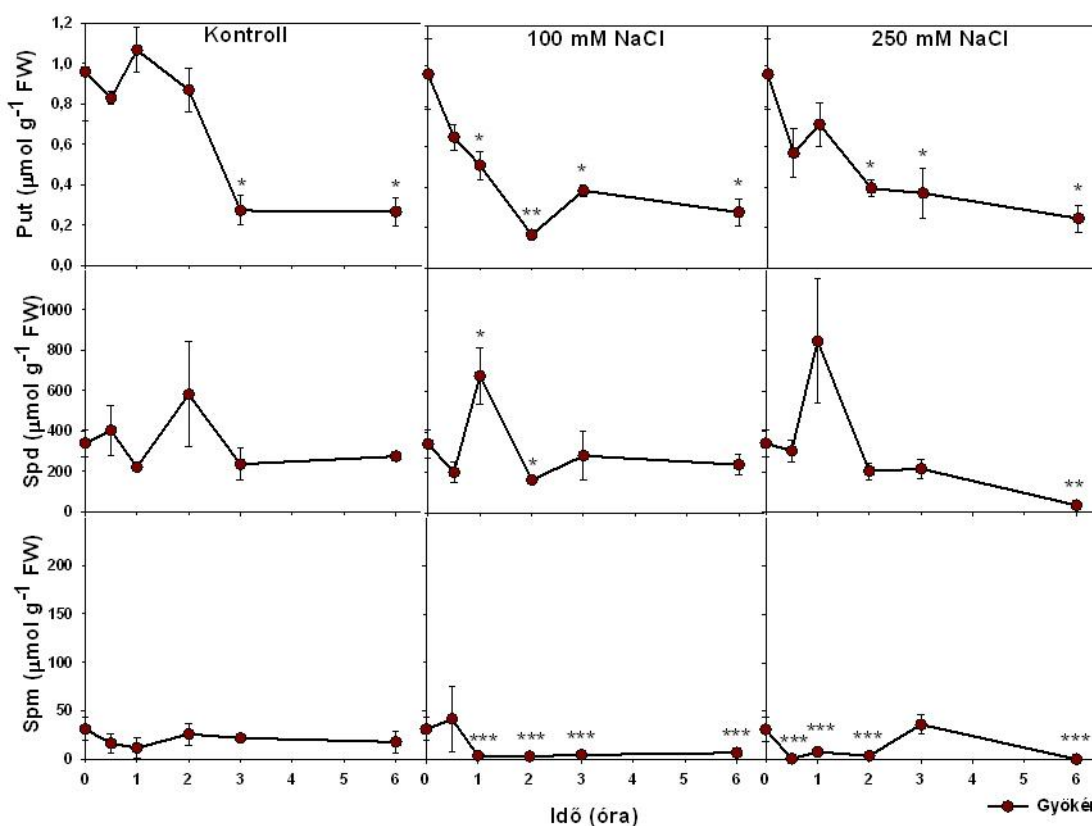


11. ábra: A ROS és a NO koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

IV. 6. A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelésnek kitett paradicsom növények gyökerében az idő függvényében

Mivel a só-stressz elsődleges támadáspontja a gyökér, ezért kísérletünk során megvizsgáltuk a 100 mM és 250 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények gyökerében is a szabad poliamin tartalom változását.

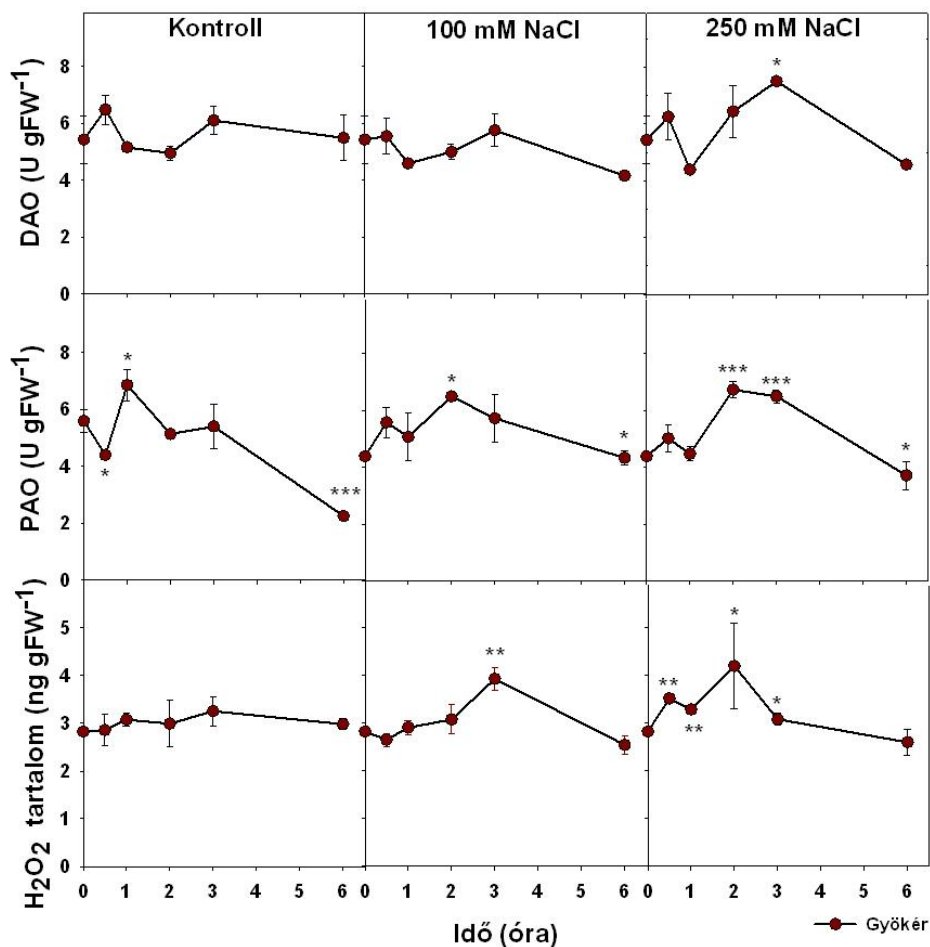
Fiziológiai körülmények között a Put és a Spd mennyisége a sperminhez képest a fiatal hajtáshoz hasonlóan a gyökérben is magasabb volt. 100 mM NaCl kezelés hatására a Put mennyisége kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent, míg a Spd koncentrációja a kezelést követő 1 órára szignifikánsan emelkedett. Ebből arra következtethetünk, hogy a „Put-pool” használódott fel a Spd szintézisére. 250 mM NaCl kezelés hatására a Put mennyisége magasabb volt, mint a 100 mM NaCl kezelés esetén. A fiatal hajtáshoz hasonlóan a 250 mM NaCl-dal kezelt növények gyökerében a Spd átmeneti emelkedés után lecsökkent, nem voltak képesek megtartani a Spd és Spm mennyiségét, amely hiányában a sejtek sem voltak képesek a só-stressz okozta károsodásokat kivédeni. Ez végül a sejtek programozott sejthalálához vezetett (12. ábra).



12. ábra: A szabad poliamin tartalom változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.001$).**

IV. 7. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása gyökérben az idő függvényében

Gyökérben mind a DAO, a PAO enzimek aktivitása, mind pedig a H_2O_2 koncentrációja kisebb mértékű, mint fiatal hajtásban. 100 mM NaCl kezelés hatására a DAO enzimaktivitása kontrollhoz közeli értéket mutatott, a kezelés végére pedig a kontroll érték alá csökkent. Ezzel szemben 250 mM NaCl kezelés hatására a DAO enzimaktivitása 0,5 óránál kisebb mértékű, 3 óránál pedig szignifikáns emelkedést mutatott. Mivel a DAO katalizálja a Put oxidációját, ezért a megnövekedett enzimaktivitás következtében a gyökér Put mennyisége is nagymértékben csökkent 0,5 óránál és 3 óránál a 250 mM NaCl-dal kezelt növények esetén. 100 mM NaCl kezelés hatására a PAO enzimaktivitása kismértékben emelkedett, míg 250 mM NaCl kezelés hatására 0,5 óránál kismértékű, 2 és 3 óránál pedig szignifikáns emelkedést mutatott az enzim aktivitása. 100 mM NaCl kezelés hatására a H_2O_2 koncentrációja a kezelést követő 3 óránál szignifikáns emelkedést mutatott, amely a kezelés végére kontroll közeli értékre csökkent. 250 mM NaCl hatására 0,5 óránál és 2 óránál szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a H_2O_2 koncentrációjában. A letális NaCl-dal kezelt paradicsom növények gyökerében a 0,5 óránál megemelkedett H_2O_2 koncentrációja olyan gének bekapcsolásában vehet részt, amelyek szerepet játszhatnak a PCD kialakításában (**13. ábra**).



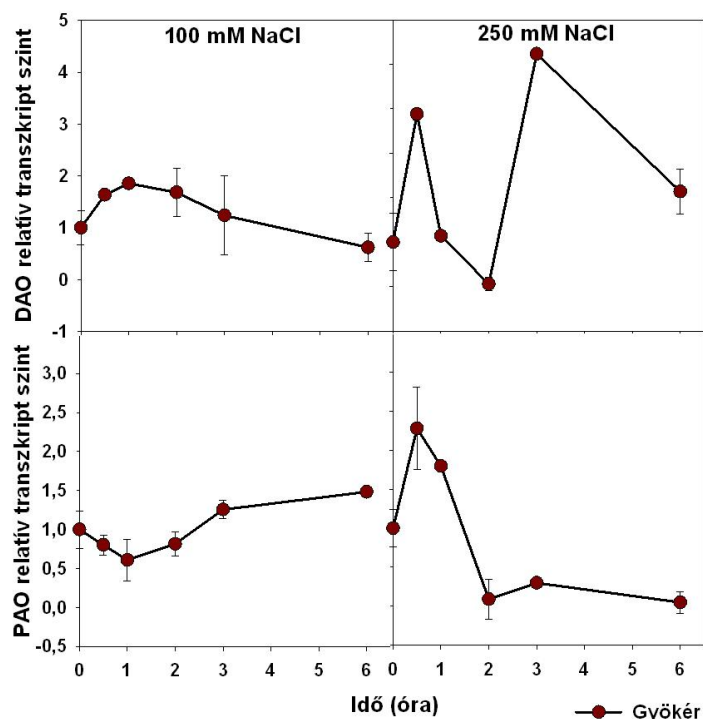
13. ábra: A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14), valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H₂O₂) mennyisége 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében. Átlagok±SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (*P≤0.05; **P≤0.01, ***P≤0.001).

IV. 8. A lebontást végző enzimek (DAO, PAO) relatív transzkript szintjének változása gyökérben az idő függvényében

A vizsgált DAO és PAO gén transzkript szintje a legmarkánsabban a 250 mM NaCl kezelés hatására emelkedett meg, míg a 100 mM NaCl kezelés esetén a transzkript szintek nem mutattak szignifikáns változást. A DAO transzkript szintje kettős csúcsot mutatott a kezelést követő 0,5 és 3 órában, amely megegyezett az enzimaktivásban bekövetkező változásokkal. A PAO transzkript szintje a 250 mM NaCl hatására hirtelen emelkedés után a kezelést követő 2 órára lecsökkent, majd a kezelés végéig (6 h) gátlódott. 100 mM NaCl kezelés hatására a DAO transzkript szintje nem mutatott olyan nagymértékű

növekedést, mint a 250 mM NaCl kezelésnél, továbbá a PAO génexpressziója 100 mM NaCl hatására az idő függvényében kismértékű, bár folyamatos emelkedést mutatott.

A két sókoncentráció hatásában tapasztalható legfontosabb különbség, hogy a 100 mM NaCl kezelés esetén a DAO és PAO transzkript szint változása kisebb mértékű volt a 250 mM NaCl kezeléshez képest. A letális sókoncentrációnál az amin-oxidázokat kodoló gének expressziójának hirtelen emelkedése mediátora lehetett a PCD kiváltásának (14. ábra).

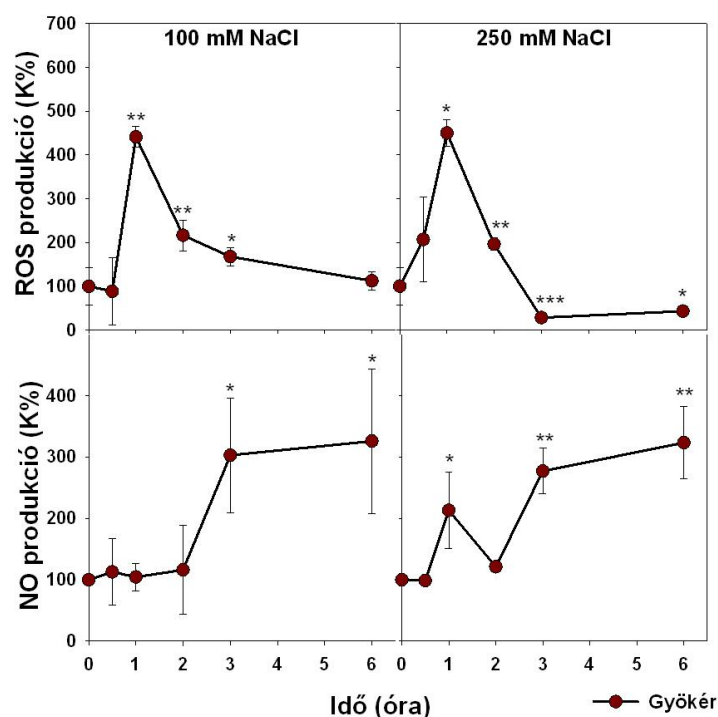


14. ábra: A DAO, PAO transzkript szint változása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A transzkript szint relatív egysége a *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego kontroll mintáiban mért relatív transzkript szint (=1).

IV. 9. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében

Kísérleteink során megvizsgáltuk a ROS és NO koncentrációját az idő függvényében 100 és 250 mM sókoncentrációval kezelt paradicsom növények gyökerében is. 100 mM NaCl kezelés hatására a gyökerek ROS tartalma a kezelést követő 1 órára szignifikáns emelkedést mutatott kontrollhoz képest, majd a kezelés végére kontrollhoz

közeli értékre csökkent. Mindeközben a NO koncentrációja a kezelést követő 2 óráig kontroll közeli értéken maradt, majd 2 óra után szignifikáns emelkedést mutatott, koncentrációja pedig a ROS koncentrációjával ellentétben a kezelés végéig magas maradt. 250 mM NaCl kezelés hatására a ROS koncentrációja a 100 mM NaCl kezeléshez hasonlóan megemelkedett, majd a kezelés végére kontroll érték alá csökkent. Azonban a NO koncentrációja a 100 mM NaCl kezeléshez képest 1 órára szignifikáns emelkedést mutatott, majd a kezelést követő 3 órára a 100 mM NaCl kezeléshez hasonlóan a kezelés végéig magas maradt. A letális koncentrációval kezelt paradicsom növények gyökerében a ROS és NO együttes jelenléte kiválthatta azon gének expresszióját, amelyek a PCD-ben játszanak fontos szerepet. Azokban a növényekben, ahol az akklimatizáció megtörténik az oxidatív és nitrozatív stressz eltérő időpontban jelentkezik a gyökereikben, amely védelmi gének bekapcsolásában is szerepet játszhat, ezáltal fokozva a stressztoleranciát (15. ábra).



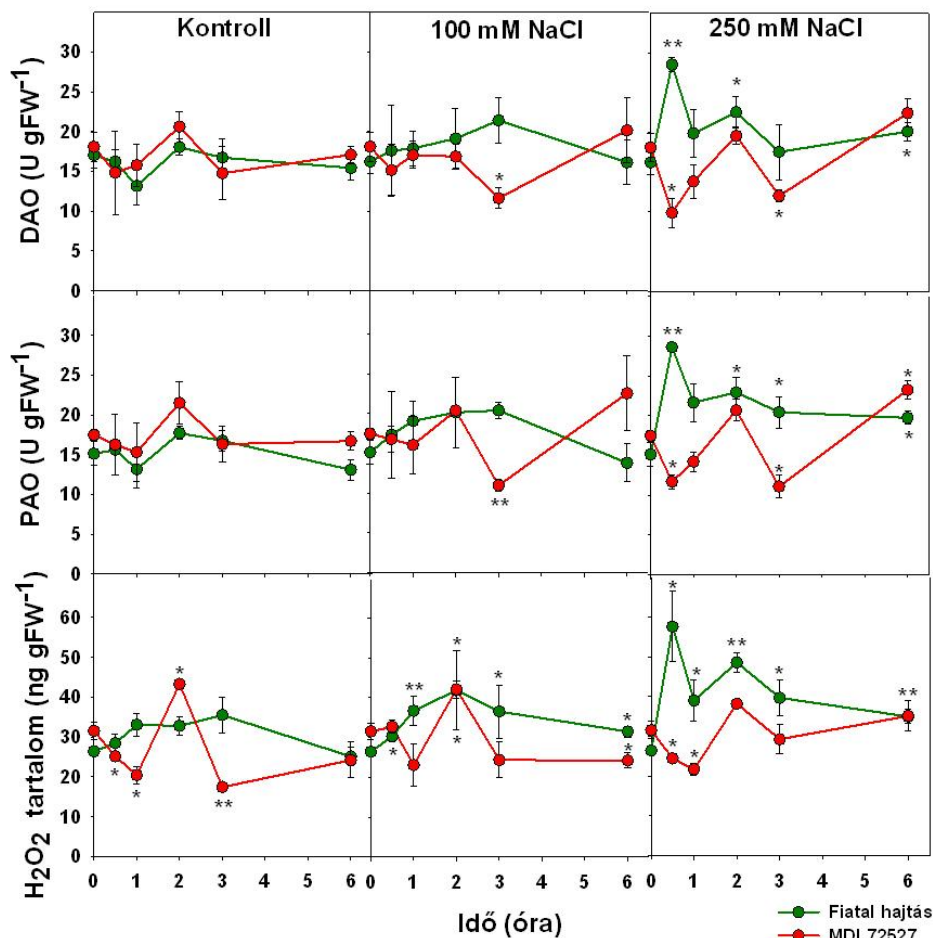
15. ábra: A ROS és a NO koncentrációjának alakulása 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A

statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$;

** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

IV. 10. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása fiatal hajtásban egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására

Mivel irodalmi adatok alátámasztották azt az elképzelést, hogy a PAO enzim által kiváltott oxidatív robbanás kulcseleme a PCD-nak, ezért megvizsgáltuk a 100 mM és 250 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények fiatal hajtásában, illetve gyökerében a DAO, PAO enzimek aktivitását, valamint a lebontás során melléktermékként keletkezett H_2O_2 mennyiségét egy specifikusan ható irreverzibilis PAO gátlószerrel, az MDL72527 alkalmazásával az idő függvényében. A gátlószer hatására a legmarkánsabb változás az volt, hogy 250 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények fiatal hajtásában a DAO és PAO enzimaktivitásában tapasztalható kettős csúcs eltűnt és csak egy csúcs jelent meg 2 óránál, amely még így is kontroll alatti értéket mutatott. A 250 mM NaCl-dal és MDL72527-tel kezelt növények fiatal hajtásában a PAO enzimaktivitása a kezelés végére szignifikáns emelkedést mutatott, amely feltételezhetően az enzim gátlása miatt megemelkedett Spd és Spm felhalmozódása miatt következhetett be. A Spd és Spm képes a negatív töltésű DNS-hez kötődni, és feltételezhetően a saját lebontásukat végző enzimek (pl. PAO) transzkripcióját befolyásolni. A megváltozott enzimaktiváshoz hasonlóan a H_2O_2 koncentrációja is lecsökkent, amely alapján elmondható, hogy az itt kimutatott H_2O_2 nagy valószínűséggel a PAO és DAO enzimek aktivitásának melléktermékeként keletkezett. Továbbá a letális koncentrációval kezelt növények fiatal hajtásában 0,5 óránál megjelenő, szignifikánsan megnövekedett DAO, PAO enzimaktivitás és H_2O_2 koncentráció fontos szerepet játszhat a PCD indukciójában, mivel ez az emelkedés a gátlószer hatására a 250 mM NaCl-dal kezelt növényekben elmaradt (**16. ábra**).

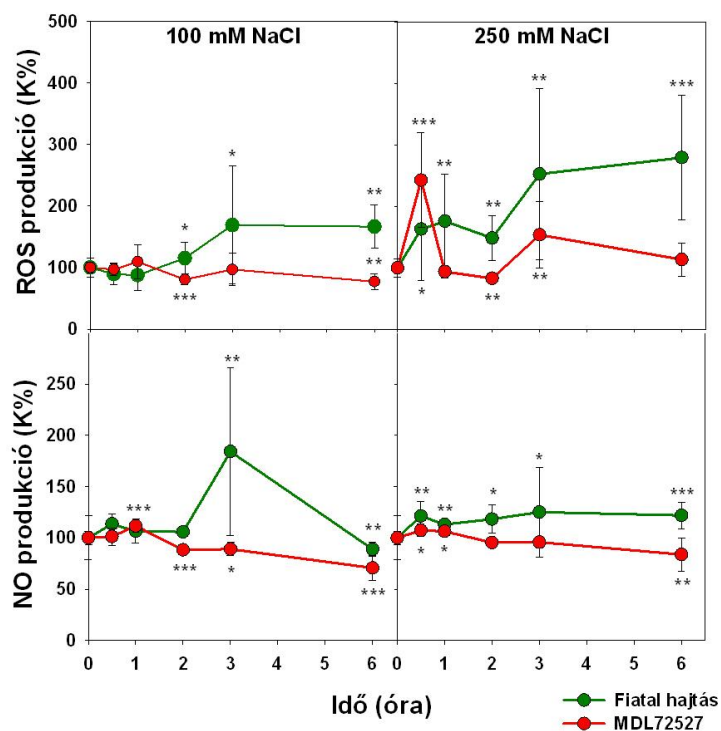


16. ábra: A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14), valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H₂O₂) mennyisége az MDL72527 gátlószer hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok±SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001).

IV. 11. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása fiatal hajtásban egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására

Megvizsgáltuk a specifikus PAO gátlószer hatására a ROS és NO koncentrációjának alakulását. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a ROS és NO tartalom mind a szubletális, mind pedig a letális sókoncentrációnál alacsonyabb értéket mutatott kontrollhoz képest az inhibítor jelenlétében. 250 mM NaCl-dal kezelt növények fiatal hajtásában az MDL72527 hatására csökkent ROS tartalom mutatkozott, amely feltételezhetően a csökkent PAO enzimaktivitásnak köszönhető. Ez a változás a 100 mM

NaCl-dal kezelt növényeknél ugyanakkor kisebb mértékű volt. A NO termelődés mindkét kezelés esetén kontroll alatti értéket mutatott, ezért a kapott eredményekből arra következtethetünk, hogy a ROS és NO időbeli alakulását nagymértékben befolyásolta a PAO enzimaktivitása, ezáltal pedig a ROS és NO koncentrációjának változásán keresztül hatással lehetett a különböző gének expressziójára is (17. ábra).

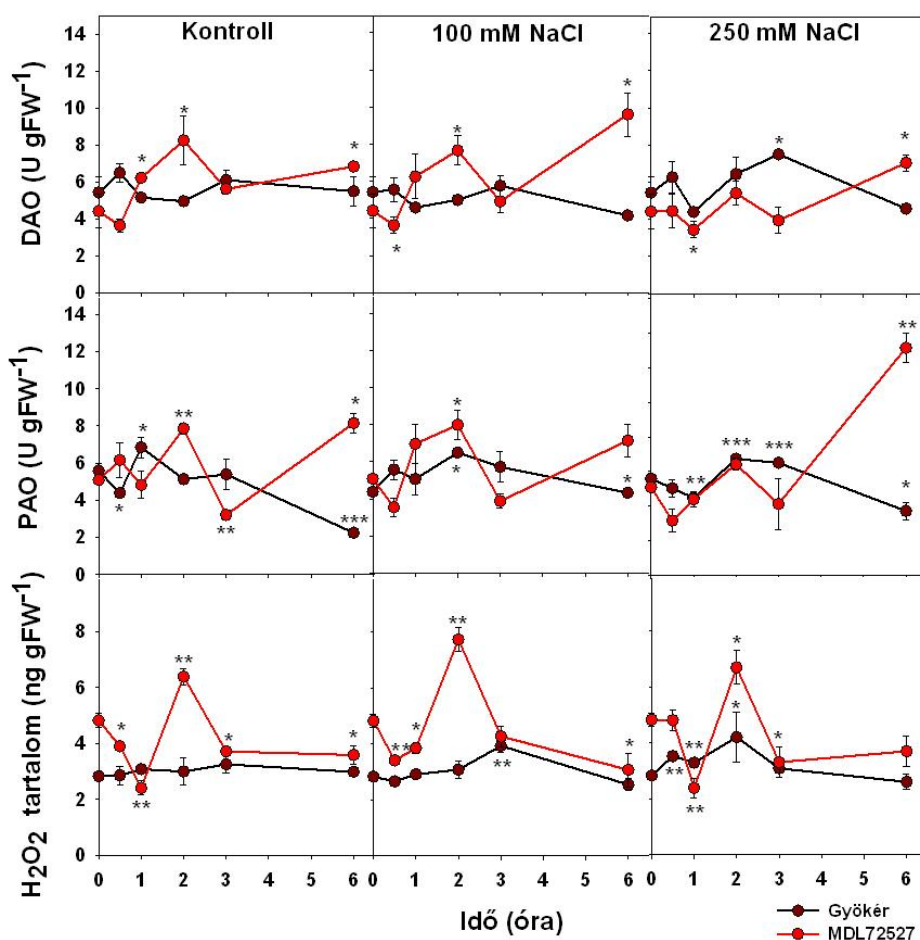


17. ábra: A ROS és a NO koncentrációjának alakulása az MDL72527 gátlószer hatására paradicsom növények fiatal hajtásában az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.001$).**

IV. 12. A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14) aktivitásának, valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyiségének változása gyökérben egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására

Az MDL72527 gátlószer hatására a 250 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények gyökerében tapasztalható PAO és DAO enzimaktivitások, valamint a H_2O_2 mennyiségének kettős csúcsa a gátlószer hatására a fiatal hajtáshoz hasonlóan itt is eltűnt és csak egy csúcs jelent meg 2 óránál. A DAO és PAO enzimek aktivitásának, illetve a H_2O_2 koncentrációjának kezdeti emelkedése eltűnt, a gátlószer hatására csökkenés volt

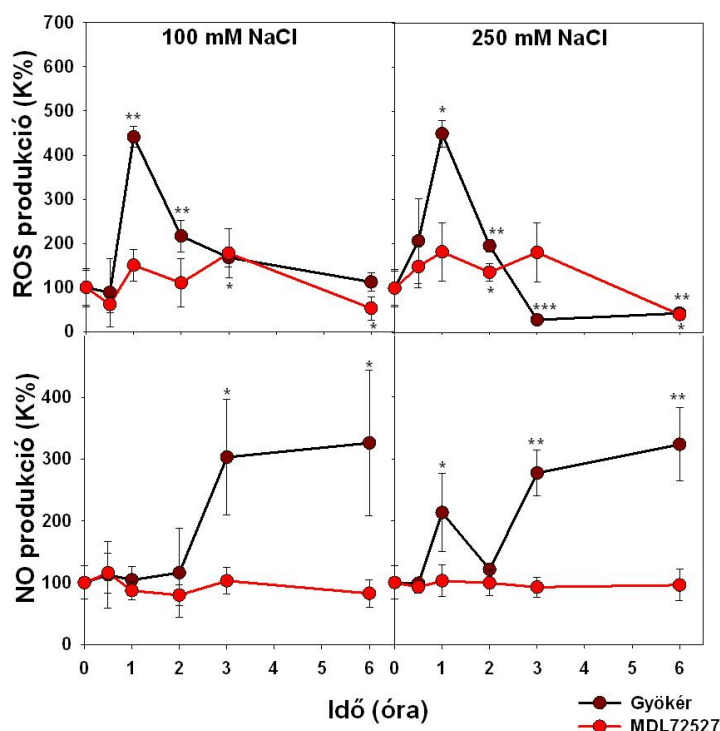
tapasztható a letális sókoncentrációval kezelt növények gyökerében. A 100 mM NaCl-dal és MDL72527-tel kezelt növények DAO enzimaktivitása a kezelés végére (6 h) magasabb aktivitást mutatott, mind a kontrollhoz mind pedig a 250 mM NaCl-dal és MDL72527-tel kezelt növények gyökeréhez képest. A 250 mM NaCl-dal és MDL72527-tel kezelt növények gyökerében a PAO enzimaktivitása a kezelés végére a fiatal hajtáshoz hasonlóan szignifikáns emelkedést mutatott, amely feltételezhetően ebben az esetben is az enzim gátlása miatt megemelkedett Spd és Spm felhalmozódása miatt következhetett be. A H_2O_2 koncentrációja 2 óránál emelkedett meg, ott, ahol a PAO és DAO enzimek aktivitása a legnagyobb, ebből arra következtethetünk, hogy az itt mért H_2O_2 mennyisége a DAO és PAO enzimek aktivitásának mellékterméke volt (18. ábra).



18. ábra: A lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz (DAO), EC 1.4.3.6; poliamin-oxidáz (PAO) EC. 1.5.3.14), valamint a lebontás során keletkezett melléktermék (H_2O_2) mennyisége az MDL72527 gátlószer hatására paradicsom növények gyökerében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

IV. 13. A reaktív oxigénformák (ROS), valamint a nitrogén-monoxid (NO) koncentrációjának alakulása gyökérben egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására

A gátlószer hatására mind a ROS, mind pedig a NO koncentrációja kontrollhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott. A 250 mM NaCl-dal kezelt paradicsom növények gyökérében tapasztalható 1 órás ROS és NO emelkedés a gátlószer hatására eltűnt, a kezelés végére a ROS termelődés kontroll értékét, míg a NO szignifikáns csökkenést mutatott. A letális sókoncentrációnál a NO kettős csúcsa eltűnt. 100 mM NaCl kezelésnél tapasztalható 1 órás szignifikáns ROS emelkedés a gátlószer hatására lecsökkent, kisebb mértékű csúcsot a kezelést követő 1 és 3 óránál kaptunk, amely kontroll közeli értéket mutatott. A 100 mM NaCl-dal kezelt növények NO koncentrációjának változása a gátlószer hatására a kontroll gyökérhez képest a kezelés végére szignifikáns csökkenést mutatott. Összességében elmondható, hogy mindkét sókoncentráció esetén a gátlószer hatására a ROS és NO termelődése szignifikáns csökkenést vagy kontroll állapotot mutatott a 6 órás kezelés végére (19. ábra).



19. ábra: A ROS és a NO koncentrációjának alakulása az MDL72527 gátlószer hatására paradicsom növények gyökérében az idő függvényében. Átlagok $\pm$ SE. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

V. Következtetések

Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a poliamin katabolizmus okozta oxidatív stressz milyen mértékben járul hozzá a stressztolerancia vagy a PCD kialakításához rövid ideig tartó alacsony (100 mM) és magas (250 mM) NaCl kezelés hatására a paradicsom növények fiatal hajtásában és gyökerében az idő függvényében. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a szubletális és letális koncentrációk milyen mértékben befolyásolják a poliaminok mennyiségét, a poliaminok oxidációját katalizáló enzimek (diamin-oxidáz DAO, poliamin-oxidáz PAO) aktivitását, valamint génexpresszióját, a lebontás során melléktermékként keletkezett H_2O_2 mennyiségét, illetve a NO és ROS koncentrációjának alakulását. Ezen folyamatok időbeli vizsgálata hozzájárulhat annak megválaszolásához, hogy a poliamin katabolizmusnak milyen szerepe van a só-stresszel szembeni tolerancia kialakításában vagy a programozott sejthalálban. Munkánk második részében megvizsgáltuk egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 alkalmazásával, hogy a PAO enzim gátlása során hogyan változnak az előzőekben felsorolt folyamatok az idő függvényében a 100 mM és 250 mM NaCl kezelésnek kitett paradicsom növények fiatal hajtásában és gyökerében.

Munkánk első lépéseként megvizsgáltuk az ionkieresztés alapján, hogy a paradicsom növények fiatal hajtása és gyökere hogyan reagál a 100 mM-os sótoleranciát kiváltó és a PCD-t indukáló, 250 mM NaCl kezelésre. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a 100 mM NaCl kezelés hatására gyökérben a plazmamembrán integritásának változása reverzibilis volt, ellenben a 250 mM NaCl kezelés hatására már 6 órán belül szignifikánsan megnőtt a gyökök elhalása.

Megvizsgáltuk a poliaminok szöveti koncentrációjának alakulását, a poliaminok lebontásában szerepet játszó enzimek (DAO, PAO) aktivitásának és génexpressziójának a változását, a lebontás során keletkezett H_2O_2 mennyiségét, valamint a NO és ROS koncentrációját az idő függvényében 100 és 250 mM NaCl kezelés hatására.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a 100 mM NaCl-dal kezelt növények fiatal hajtásában és gyökerében a DAO és PAO enzimek kismértékű aktivitás emelkedést mutattak, amelynek következtében ezek a növények képesek voltak a kezelés végéig megtartani a Spd és Spm mennyiségét. A kismértékű enzimaktivitás miatt a poliaminok nem bomlottak le, ezért a H_2O_2 koncentrációja is kisebb mértékben emelkedett meg. A H_2O_2 tartalom hatással lehet a DAO és PAO gének expressziójára is. A 100 mM NaCl-dal kezelt növényekben, ott ahol a H_2O_2 koncentrációja magas volt, nőtt a DAO

transzkript szintje, eközben a PAO transzkript mennyisége csökkent vagy kontroll közeli értéket mutatott. A kezelés azon időpontjainál, ahol a H_2O_2 mennyisége csökkent, ott a DAO transzkript szintje is szignifikáns csökkenést mutatott, ezzel szemben a PAO transzkript szintje emelkedett. Fiatal hajtásban a ROS emelkedését megelőzte a H_2O_2 tartalom emelkedése. Fiatal hajtásban és gyökérben a ROS koncentráció növekedését NO emelkedés követte. Gyökérben a 3 órás NO akkumulációt egy emelkedett H_2O_2 koncentráció kísérte. Összefoglalásképpen elmondható, hogy a 100 mM NaCl kezelés hatására a DAO és PAO enzimek alacsony aktivitása miatt alacsony H_2O_2 szabadult fel, amely hatással volt a DAO és PAO gének expressziójára. **A só-stressz akklimatizációjához szükséges védelmi gének bekapcsolásában védelmi szignálmolekulák egymást követő jelenlétének lehetett fontos szerepe: a kezdeti ROS-nak, azon belül is a H_2O_2 -nak és végül a NO emelkedésének.**

250 mM NaCl kezelés hatására fiatal hajtásban és gyökérben a DAO és PAO enzimek aktivitása 0,5 és 2 óránál kettős csúcsot mutatott, amelyek jól korreláltak a H_2O_2 koncentrációjának változásával. A magas enzimaktivitások miatt ezek a növények nem voltak képesek megtartani a Spd és Spm mennyiségét, amelyek hiánya nagymértékben hozzájárulhatott a PCD indukciójához. A H_2O_2 kettős csúcsot mutató emelkedése 0,5 és 3 óránál DAO transzkript szintnövekedést eredményezett a fiatal hajtásban és gyökérben. Fiatal hajtásban a 0,5 óránál megjelenő H_2O_2 szint csökkentette a PAO transzkript szintjét, míg gyökérben a 2 órás H_2O_2 szintnövekedés nagymértékben gátolta a PAO génexpressziót. **Fiatal hajtásban és gyökérben a H_2O_2 , ROS és NO koncentrációja a kezelést követő 1 óránál nagymértékben megemelkedett, melyek együttes jelenléte a programozott sejthalálban szerepet játszó gének bekapcsolásában vehet részt.**

Munkánk második részében megvizsgáltuk egy specifikus PAO gátlószer, az MDL72527 hatására a PAO, DAO enzimek aktivitását, továbbá ezeknek az enzimeknek a működése során a H_2O_2 , ROS és NO koncentrációjának alakulását. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a DAO és PAO enzimek aktivitása 100 mM NaCl kezelést kapott növények fiatal hajtásában és gyökerében is kontrollhoz közeli értéket mutatott, a H_2O_2 koncentrációjának alakulása jól korrelált az enzimaktivitásokkal az idő függvényében. A ROS és NO mennyisége a gátlószer hatására nagymértékben lecsökkent a fiatal hajtásban és gyökérben.

250 mM NaCl kezelés hatására a kezeletlen minták gyökerében és fiatal hajtásában tapasztalható kettős csúcs a gátlószer hatására eltűnt, és csak egy csúcs jelent meg 2 óránál. A kezdeti H_2O_2 emelkedés is eltűnt ezekben a növényekben a gátlószer hatására, ami

alapján elmondható, hogy feltételezhetően az itt megjelenő H_2O_2 mennyisége a PAO és DAO enzimek működésének köszönhető. A gátlószer hatására a fiatal hajtás ROS és NO emelkedése elmaradt a kezelés végére, mindössze egy csúcs jelent meg 0,5 óránál. A gátlószer hatására a 250 mM NaCl-dal kezelt növények gyökerében az 1 órás ROS és NO emelkedés eltűnt, a kezelés hatására nem volt tapasztalható a kontrollhoz hasonló szignifikáns emelkedés.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a Spd és Spm poliamin-oxidázok által katalizált lebontása 250 mM-os NaCl kezelés esetén hozzájárult a PCD kiváltásához, amelyben nem csak a H_2O_2 -nak, hanem a PAO inhibitor által szintén gátolható NO képződésnek is szerepe van. Új eredménynek tekinthető, hogy a poliaminok katabolizmusa nem csak a H_2O_2 , hanem a NO generálásával is hozzájárul a PCD indukciójához a só-stressznek kitett paradicsom növényekben.

VI. Irodalomjegyzék

- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signalling in plants. *Journal of Plant Biology* **51**: 167-173
- Alcázar R, Marco F, Cuevas J.C, Patrón M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio A.F, Altabella T (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett* **28**: 1867-1876
- Athwal G.S, Huber S.C (2002) Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant J.* **29**: 119-129
- Bagni N, Tassoni A (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**: 301-317
- Bakhanashvili M, Novitsky E, Levy I, Rahav G (2005) The fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increases in the presence of polyamines. *FEBS Letters* **579**: 1435-1440
- Binda C, Coda A, Angelini R, Federico R, Ascenzi P, Mattevi A (1999) A 30-Å-long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**: 265-276
- Cervelli M, Di Caro O, Di Penta A, Angelini R, Federico R, Vitale A, Mariottini P (2004) A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J.* **40**: 410-418
- Cohen S.S (1998) A Guide to the Polyamines. *Oxford University Press*, Oxford.
- Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Marottini P, Moreno S, Angelini R (2003) Polyamine Oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is upregulated by light and downregulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl. *Plant Physiol.* **131**: 803-813
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidase in plant development and defence. *Trends in Plants Sci.* **11**: 80-88
- Corpas F.J, Barroso J.B, Carreras A, Quirós M, León A.M, Romero-Puertas M.C, Esteban F.J, Valderrama R, Palma J.M, Sandalio L.M, Gómez M, del Río L.A (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* **136**: 2722-2733
- De Pinto M.C, Locato V, De Gara L (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environment* **35**: 234-244
- Fan H-F, Du C-X, Guo S-R (2010) Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environmental and Experimental Botany* doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.09.07
- Fiorillo A, Federico R, Polticelli F, Boffi A, Mazzei F, Di Fusco M, Ilari A, Tavladoraki P (2011) The structure of maize polyamine oxidase K300M mutant in complex with the natural substrates provides a snapshot of the catalytic mechanism of polyamine oxidation. *FEBS J.* **278**: 809-821
- Flores H.E, Galston A.W (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **69**: 701-706

Flores H.E (1991) Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: Slocum R.D, Flores H.E (szerk.) *The biochemistry and physiology of polyamines in plants. CRC Press, Boca Raton, FL*, pp 214-255

Gallé Á (2010) Búzafajták ozmotikus-és szárazságstressz alatti akklimatizációja, a glutation transzferázok szerepe a stresszválaszban. Doktori (PhD) értekezés, Szegedi Tudományegyetem

Garcia-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* **128**: 790-792

Gémes K, Poór P, Horváth E, Kolbert Zs, Szopkó D, Szepesi Á, Tari I (2011) Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiol. Plant.* **142**: 179-192

Gill S.S, Tuteja N (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signalling and Behavior* **5**: 26-33

Groppa M.D, Benavides M.P (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino acids* **34**: 35-45

Ha H.C, Woster P.M, Yager J.D, Casero R.A Jr (1997) The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11557-11562

Hideo Yamasaki, Michael F. Cohen (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants. *Trends in Plant Sci.* **11**: 522-524

Holmstead B, Larson L, Tham R, (1961) Further studies on spectrophotometric methods for the determination of amine oxidase activity. *Biochem. and Biophys. Acta* **48**: 182-186

Hu R.H, Pegg A.E (1997) Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *Biochem. J.* **328**: 307-316

Huh G-H, Dansz B, Matsumoto T.K, Reddy M.P, Rus A.M, Ibeas J. I, Narasimhan M.L, Bressan R.A, Hasegawa P.M (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* **29**: 649-659

Hung K.T, Chang C.J, Kao C.H (2002) Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *J. Plant Physiol.* **159**: 159-166

Kolbert Zs, Pető A, Lehotai N, Feigl G, Ördög A, Erdei L (2012) In vivo and in vitro studies on fluorophore-specificity. *Acta Biol. Szeged.* **56**: 37-41

Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007) Advances in polyamine research. *J. Plant Res.* **120**: 345-350

Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta.* **228**: 367-381

Kuznetsov V.V, Shevyakova N.I (2007) Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress* **1**(1): 50-71

Landry J, Sternglanz R (2003) Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **303**: 771-776

- Leshem Y.Y, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria anannasa* (Duch.) and avocados (*Persea americana* (Mill.). *J. Exp. Bot.* **51**: 1471-1473
- Liu J.H, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* **24**: 117-126
- Manjunatha G, Lokesh V, Neelwame B (2010) Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnol. Adv.* **28**: 489-499
- Mansour M.M.F, Al-Mutawa M.M (1999) Stabilization of plasma membrane by polyamines against salt stress. *Cytobios.* **100**: 7-17
- Martin-Tanguy Y. (2008) The occurrence and possible functions of hydroxycinnamoyl acid amines in plant. *Plant Growth Regul.* **3**: 381-399
- Minguet E.G, Vera-Sirera F, Marina A, Carbonell J, Blazquez M.A (2008) Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 2119–2128
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti V.B, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Breusegem F.V (2011) ROS signalling: the new wave? *Trend sin Plant Sci.* **16**: 300-309
- Moschou P.N, Paschalidis K.A, Delis I.D, Andriopoulou A.H, Lagiotis G.D, Yakoumakis D.I, Roubelakis-Angelakis K (2008a) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *The Plant Cell* **20**: 1708-1724
- Moschou P.N, Sanmartin M, Andriopoulou A.H, Rojo E, Sanchez-Serrano J.J, Roubelakis-Angelakis K.A (2008b) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 1845-1857
- Nadeau P, Delaney L, Chouinard (1987) Effects of cold hardening on the regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **84**: 73-77
- Neill S. J, Desikan R, Hancock J.T (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**: 11-35
- Paschalidis and Roubelakis-Angelakis (2005) Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression and vascular development. *Plant Physiol.* **138**: 2174-2184
- Poór P, Kovács J, Szopkó D, Tari I (2012) Ethylene signalling in salt-stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma* DOI: 10.1007/s00709-012-0408-4
- Qiao W, Fan L.-M (2008) Nitric oxide signalling in plant responses to abiotic stresses. *J. Integrative Plant Biol.* **50**: 1238-1246
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser W.M (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **53**: 103-110
- Sarath G, Bethke P.C, Jones R, Baird L.M, Hou G, Mitchell R.B (2006) Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta.* **223**: 1154-1164

- Šebela M, Radová A, Angelini R, Tavladoraki P, Frébort I, Pěc P (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* **160**: 197-207
- Seiler N, Durantón B, Raul F (2002) The polyamine oxidase inactivator MDL 72527. *Prog Drug Res.* **59**:1-40
- Seiler N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **26**: 217-233
- Rozen S, Helen J, Skaletsky (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (szerk.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa NJ, pp 365-386
- Szepesi Á, Csiszár J, Gémes K, Horváth E, Horváth F, Simon L.M, Tari I (2009) Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na^+ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* **166**: 914-925
- Sun J, Li L, Liu M, Wang M, Ding M, Deng S, Lu C, Zhou X, Shen X, Zheng X, Chen S (2010) Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K^+/Na^+ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **103**: 205-215
- Tang W, Charles T.M, Newton R.J (2005) Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Mol. Biol.* **59**: 603-617
- Tari I, Csiszár J (2003) Effects of NO_2^- or NO_3^- supply on polyamine accumulation and ethylene production of wheat roots at acidic and neutral pH: implications for growth. *Plant Growth Regul.* **40**: 121-128
- Tavladoraki P, Rossi M.N, Saccuti G, Perez-Amador M.A, Polticelli F, Angelini R, Federico R. (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back-conversion. *Plant Physiol.* **141**: 1519-1532
- Thomas T, Thomas T.J (2003) Polyamine metabolism and cancer. *J. Cell Mol. Med.* **7**: 113–126
- Tun N.N, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh E.I.S, Scherer G.F.E (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**: 346-354
- Tun N.N, Livaya M, Kieber J.J, Scherer G.F.E (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two component signalling genes. *New Phytol.* **178**: 515-531
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett* **579**: 1557–1564
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* **151**: 59-66
- Verma S, Mishra SN (2005) Putrescine alleviation of growth in salt-stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defence system. *J. Plant Physiol.* **162**: 669-677

- Vujcic S, Liang P, Diegelman P, Kramer DL, Porter CW (2003) Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion. *Biochem J.* **370**: 19-28
- Wallace H.M, Fraser A.V, Hughes A (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* **376**: 1–14
- Wang Y, Chen C, Loake G.J, Chu C (2010) Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell* **1**: 133-142
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer G (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* **181**: 593-603
- Wu T, Yankovskaya V, McIntire W.S (2003) Cloning, sequencing and heterologous expression of the murine peroxisomal flavoprotein, N¹-acetylated polyamine oxidase. *J. Biol. Chem.* **278**: 20514-20525
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **580**: 6783-6788
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael A.J, Kusano T (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**: 486–490
- Yamasaki H, Cohen M.F (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* **11**: 522-524
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* **142**: 193-206
- Zapata P.J, Serrano M, Pretel M.T, Botella M.A (2004) Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci.* **167**: 781-788

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Görgényi Miklósné, Dr. Tari Irma, tanszékvezető egyetemi docensnek és Dr. Szepesi Ágnes, egyetemi tanársegédnek, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a TDK munkám elvégzéséhez és kiváló szakmai tudásukkal és hasznos tanácsaikkal segítették TDK dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom Dr. Gallé Ágnes, egyetemi tanársegédnek, a molekuláris vizsgálatokban és a primer tervezésben nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Poór Péter egyetemi tanársegédnek és Kovács Judit doktorandusz hallgatónak a kísérletek kivitelezésében való segítségükért, szakmai és emberi támogatásukért.

Szeretnék köszönetet mondani Orosz Gábornak és Schvarckopf Tamásnak, V. éves egyetemi hallgatóknak, legjobb barátaimnak, hogy segítettek munkámat és támogattak a TDK dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm továbbá Ádámné Meszlényi Máriának és Tandari Máriának és a tanszék valamennyi munkatársának a kísérletek megvalósításához nyújtott segítségét.

Végző soron szeretném megköszönni szüleimnek és nagyszüleimnek a mérhetetlen nagy segítségüket, és támogatásukat, amellyel segítik egyetemi tanulmányaimat és pályafutásomat.

VIII. Nyilatkozat

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Takács Zoltán a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- Növénynevelést
- a szabad poliaminok kivonását
- a lebontást végző enzimek (diamin-oxidáz DAO, és poliamin-oxidáz PAO) aktivitásának meghatározását
- a H_2O_2 mennyiségének meghatározását
- ROS és NO fluoreszcens képek kiértékelését
- PCR reakció összeállítását és kiértékelését
- ábrakészítést

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2012. december 19.