

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék
XXXI. OTDK Biológia Szekció

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**A nitrogén-monoxid és a prolin kapcsolatának
vizsgálata *Arabidopsis thaliana* L. növényekben réz
stressz alatt**

Tugyi Nóra
Biológus MSc II. évfolyam

Témavezető: Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna

Szeged, 2012

Tartalomjegyzék

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A réz, mint esszenciális és toxikus nehézfém

- 1.1.1. A réz szerepei a növényi sejtekben2
- 1.1.2. A réz felvétele és transzportja a növényben.....2
- 1.1.3. A réz toxicitása.....3

1.2. A reaktív oxigénformák (ROF) és az oxidatív stressz

- 1.2.1. A reaktív oxigénformák fajtái.....4
- 1.2.2. A ROF-k képződése réz stressz alatt.....5
- 1.2.3. A ROF-k szerepei a nehézfém stressz során.....7

1.3. A reaktív nitrogénformák (RNF) és a nitrozatív stressz

- 1.3.1. A reaktív nitrogénformák fajtái.....8
- 1.3.2. A NO képződése a növényi sejtekben.....8
- 1.3.3. A nitrogén-monoxid szerepe nehézfém stressz alatt.....10

1.4. A prolin, mint multifunkcionális aminosav

- 1.3.1. A prolin felhalmozódása.....11
- 1.3.2. A prolin szabályzó szerepei nehézfém stressz során12
- 1.3.3. A prolin és a reaktív jelmolekulák (ROF és RNF) kapcsolata.....13

2. CÉLKITŰZÉS.....15

3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

- 3.1. Növényi anyag és nevelési körülmények.....16
- 3.2. Morfológiai mérések.....18
- 3.3. Prolin koncentráció meghatározása18
- 3.4. A reaktív nitrogénformák detektálása fluoreszcens mikroszkópiás módszerrel gyökércsúcsokban.....19
- 3.5. A reaktív oxigénformák kimutatása gyökércsúcsokban, fluoreszcens mikroszkópos technikákkal.....19
- 3.6. Az életképesség meghatározása fluoreszcens mikroszkópiás módszerrel gyökércsúcsokban.....20
- 3.7. Statisztikai analízis.....20

4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

4.1.	Prolin koncentráció változása réz-kezelt <i>Arabidopsis</i> ban	21
4.2.	Réz indukálta morfológiai változások összehasonlítása vad típusú és prolin hiányos mutáns <i>Arabidopsis</i> növényekben.....	23
4.3.	Reaktív nitrogénformák (RNF) keletkezése réz-kezelt <i>Arabidopsis</i> gyökércsúcsokban.....	25
4.4.	Reaktív oxigénformák (ROF) képződése réz-kezelt <i>Arabidopsis</i> gyökércsúcsokban.....	26
4.5.	Életképesség változása réz kezelés alatt <i>Arabidopsis</i> gyökércsúcsokban.....	29
5.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	30
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	34
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	40
9.	NYILATKOZAT.....	41

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A réz, mint esszenciális és toxikus nehézfém

A nehézfémek a földkéreg alkotóelemei, megtalálhatók a kőzetekben, talajokban, az élőlényekben. A többi fémtől eltérően a sűrűségük nagyobb, mint 5 g/cm^3 . A higanynak (Hg), kadmiumnak (Cd) és az ólomnak (Pb) nincs élettani funkciója, így ezek nem alapvetően szükségesek a növények számára (Láng 1998). Vannak azonban olyan nehézfémek is, melyek az élőlények számára esszenciálisak, mint például a cink (Zn), a réz (Cu), a vas (Fe), a mangán (Mn), valamint a molibdén (Mo). Emellett egyes fajok igénylik a kobaltot (Co) és a nikkelt (Ni) is.

A növények és a nehézfémek közötti összetett kapcsolat jellege lehet pozitív és negatív. Kis mennyiségben (10^{-6} M) bizonyos nehézfémek esszenciális mikroelemként funkcionálva jelentős szerepet töltenek be a növények növekedésében és fejlődésében.

A nehézfémek természetbe kerülésének lehetséges módjai közül elsősorban az antropogén források a legjelentősebbek, közülük is az ipari tevékenység (kohászat), ipari eredetű hulladékok, fosszilis energiahordozók égéstermékai, valamint a nagy mennyiségben kikerülő szennyvíz, amelyben a fémek kelátjaik formájában vannak jelen, melyek könnyen hozzáférhetők a növények számára. További meghatározó forrásai a nehézfémeknek a mezőgazdaság által természetbe kerülő műtrágyák, melyek ismereteseek talajsavanyító hatásukról is. A savas pH szintén kedvez a fémek akkumulációjának, amely végül így nehézfém szennyezéshez vezet. Fontos megemlíteni a közlekedést is, mely esetben egyrészt a járművek alkatrészeinek kopása során kerül a környezetbe a toxikus fém, másrésztől nem elhanyagolhatóak a kipufogógáz összetételében szereplő nehézfémek sem (Csathó 1994).

Hazánk talajai a nemzetközi viszonylatokhoz mérten több kadmiumot, vasat és nikkelt tartalmaznak - derült ki az utóbbi évtizedekben végzett felmérésekből (Ötvös és mts. 2003). A szennyezettség különösen az ipari területek, forgalmas autópályák térségében jellemző.

A talaj korlátozott ideig képes pufferelni a nehézfémek okozta változásokat, ám a pufferező hatás maximumának elérése után már képtelen detoxifikálni azokat. Ezek a fémek felhalmozódva a növényekben nehézfém stresszt váltanak ki, továbbá bekerülve a táplálékhálózatba, károsítják az élő szervezeteket. E tények ismeretében a nehézfémek növényekben történő akkumuláció-vizsgálata nagy jelentőségű és elhanyagolhatatlan.

1.1.1. A réz szerepei a növényi sejtekben

A nehézfémek közül dolgozatomban a rézzel foglalkozom részletesebben, amely esszenciális mikroelemként kulcsfontosságú szerepet tölt be a növények számos növekedési és fejlődési folyamatában, így részt vesz a fotoszintetikus elektrontranszport láncban, az etilén hatásmechanizmusában, a sejtfal metabolizmusban és a molibdén kofaktor szintézisében (Yruela 2009).

A réz jelentős szerepét azáltal éri el, hogy számos enzim kofaktoraként funkcionál, mint a Cu/Zn szuperoxid dizmutáz, amelynek *Arabidopsisban* 3 izoformája is megtalálható. Számos oxidáz, így a mitokondriális citokróm-c oxidáz, az amin-oxidáz, az apoplastikus térben lokalizálódó aszkorbát-peroxidáz és a lakkáz, valamint a kloroplasztiszban a polifenol-oxidáz szintén rezet igényel működéséhez (Yruela 2009).

1.1.2. A réz felvétele és transzportja a növényben

A növények hozzáférését a fémekhez két fő tényező befolyásolja: a talaj és a fémek kémiai tulajdonságai.

A réz nagy affinitással kötődik a talaj szilárd fázisában a kolloid részecskékhez, valamint a talajoldatban jelen levő szerves anyagokhoz, amelyekhez savas pH-n kapcsolódva szolubilizálódik. Ebben az állapotban a legkönnyebben felvehető, hiszen ekkor ion formában van jelen. A talaj lúgos kémhatása viszont növeli a csapadékképző folyamatokat, így magas pH-n a réz kevésbé hozzáférhető a növények számára (Carrillo-González és mts. 2006).

A réz felvételét növelheti a növény is azáltal, hogy fémkelátoló anyagokat választ ki a rizoszférába, mint például szerves savakat (citromsav, almasav), aminosav származékokat (mugineinsav, nikociánamin), fitosziderofórokat, valamint kis molekulású fehérjéket (metallotionein), amelyek komplexet képezve a fémmel bejuttatják azt a gyökérsejtekbe (Yruela 2009). A mikorrhiza kapcsolatban a növény gombapartnerei szintén képesek kelátoló anyagok szekréciójára (Hinsinger és Courchesne 2007). Ezekre a molekulákra akkor van szükség, amikor kevés a fém a növény rizoszférájában.

A réz felvételének konkrét mechanizmusáról és a sejten belüli transzportjáról keveset tudunk, ám az utóbbi évtizedben gyors fejlődésnek indult e téma kutatása.

A réz rövidtávú transzportját specifikus transzporter molekulacsaládok biztosítják, amelyek a gyökér különböző sejtrétegein átjuttatják a rezet, majd segítik betöltődését a xilémbe (Yruela 2009).

A hosszú távú transzport a szállítóelemekben történik, szintén kelátokkal alkotott komplexben. Ilyen kelátor molekula a már a felvételben is szerepet játszó mugineinsav (MA) és a nikotinamin (NA), melyek olyan esszenciális fémek transzportjában vesznek részt, mint a Cu, Zn, Fe, Mn és a Ni (Curie 2009). A transzport végén a mikroelem eljut a fotoszintézis helyére és beépül számos, az elsődleges anyagcsere során szintetizálódó fehérjébe, amelyeket az előző bekezdés foglal össze.

1.1.3. A réz toxicitása

A réz koncentrációja vegetatív növényi szövetekben függ a növényfajtól, ökotípustól, fejlődési állapottól, környezeti tényezőktől, mint a nitrogén ellátottság vagy a talaj kémiai tulajdonságai, így a toxikusnak számító koncentrációt nehéz meghatározni (Yruela 2009). A növények saját anyagcsere folyamataik szabályozásával próbálják a réz homeosztázisát fenntartani mind réz hiány, mind pedig többlet esetén.

Egyes növényfajok kimondottan sok rezet képesek akkumulálni anélkül, hogy bármilyen károsodást szenvednének. Ezek a Cu-hiperakkumulálók, mint például az *Arabidopsis halleri* (lúdfű), a *Silene vulgaris* (hólyagos habszegfű) és a *Thlaspi caerulescens* (havasalji tarsóka) (Yruela 2009).

A legtöbb növényfaj azonban jellemzően inkább érzékenyen reagál a megnövekedett réz koncentrációra, hiszen elsősorban a fotoszintetikus apparátus sérül, amely háttérben elsősorban a réz többlet okozta vashiányban áll. A szintén esszenciális fém hiányának következményeként redukálódik a porfirin váz szintézise, amely a klorofill bioszintézisének nélkülözhetetlen lépése, és amely következményeként a kloroplasztisz gránumjait alkotó klorofillok mennyisége lecsökken (Patsikka és mts. 2002). A folyamatot a leveleken fehér léziók formájában megjelenő érközi klorózis jelzi.

A klorofillok működése is zavart szenved azáltal, hogy a réz a központi magnéziumion helyére épül be (Küpper és mts. 2003). A réz kloroplasztiszt károsító hatása a fotoszintézis gátlásához vezet, ami pedig a növekedés leállítását eredményezi, így a réz toxicitást a morfológiai vizsgálatok során a biomassza csökkenése is jelzi.

Teljes növény szintjén megfigyelhető a hajtás és levélméret csökkenése, amit a levélcsúcsok és -szélek nekrotikus elváltozása kísér (Taylor és Foy 1985).

A réz többlete jelentősen befolyásolja a gyökérzet növekedését és szerkezetét is, és ez a hatás általában a hajtáson bekövetkező változások előtt jelenik meg.

A réz toxikus koncentrációi a fő- és oldalgyökerek megnyúlásának csökkentését, a főgyökerek vastagodását, az oldalgyökerek és a gyökérszőrök képződésének gátlását okozzák (Reichman 2003).

Emellett a réz többlet által okozott sejtszintű változások között számon tartjuk a megnövekedett számú kisebb méretű, kerek kloroplasztiszokat, melyek denzebb belső membránokkal rendelkeznek (Bernal és mts. 2006b, 2006c.) A réz-kezelt növények gyökerében az epidermisz sejtek károsodnak, a kortexben nagyméretű, megvastagodott falú sejteket találunk, a központi hengerben pedig a xilém elemek átmérője megnövekszik (Panou-Fitlotheou and Bosabalidis 2004).

A növények a magas rézkoncentráció csökkentésére, avagy a stressz tolerancia fokozása érdekében több stratégiával is rendelkeznek. Ezen stratégiák egyike a réz felvételét segítő exudátumok mennyiségének mérséklése, továbbá a réz növényen belüli eloszlásának szabályozása (a gyökérben halmozódik fel nagyobb mértékben), a rezet kipumpáló efflux csatornák stimulálása, valamint a kelátor molekulák (metallotioeninek, fitokelatinok) szintézisének indukciója, amelyek a rezet megkötve kompartmentalizálják azt a vakuólumban, kizárva így a sejt érzékeny, citoszolikus régiójából (Puig és mts. 2007).

1.2. A reaktív oxigénformák (ROF) és az oxidatív stressz

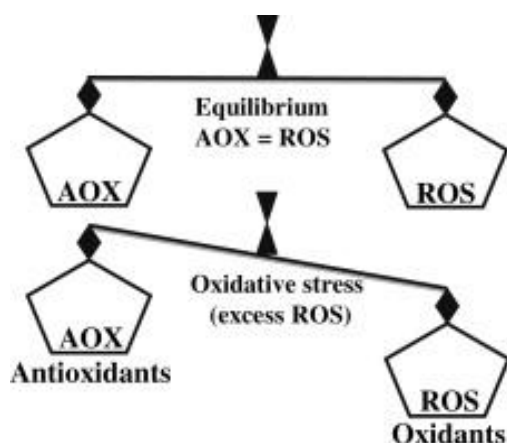
1.2.1. A reaktív oxigénformák fajtái

A reaktív oxigénformák az aerob élet nem kívánt velejárói. Megjelenésük a molekuláris oxigén légkörbe kerüléséhez köthető (Halliwell 2006), hiszen annak részleges redukciója, vagy aktivációja révén jönnek létre (Asada és Takahashi 1987).

Elkülöníthetjük a ROF-kat a reakcióképességük, féléletidejük és diffúziós képességük alapján. A molekuláris oxigén aktivációja révén jön létre a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), részleges redukciója révén pedig a szuperoxid gyökanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), amely kevésbé reaktív, rövid féléletidővel rendelkezik, és a biológiai membránokon nem képes átdiffundálni. Ezért tovább alakul hidrogén-peroxiddá (H_2O_2), amely az aquaporin csatornákon keresztül viszont képes átjutni a sejtmembránokon (Pastori és Foyer 2002).

Ez a képessége lehetővé teszi, hogy fontos jelmolekulaként jelentős szerepet játsszon az abiotikus és biotikus stressz kiváltotta sejtválaszokban (Torres és Dangl 2005). A H_2O_2 oxidációja révén hidroxilgyökké ($\text{OH}^\bullet$) alakul, amely a ROF-k közül a legreaktívabb. A $\text{O}_2^{\bullet-}$ átalakulhat hidroperoxid gyökké ($\text{HO}_2^\bullet$) is, amely ugyancsak átjut a membránon, emellett a lipidek auto-oxidációjára képes, lipid hidroperoxidokat kialakítva.

Az aerob környezetben élő szervezetekben evolúciósan kialakult egy, a ROF-kat elimináló antioxidáns rendszer. Egyensúlyi állapotban a keletkező ROF-kat (ROS) az antioxidánsok (AOX) eliminálják, viszont különböző környezeti stressz, így a nehézfém stressz esetén is eltolódik az egyensúly a ROF keletkezésének javára. Ekkor beszélünk oxidatív stresszről, amely során a sejtek jelentősen károsodnak (Tuteja és mts. 2010, **1.ábra**).

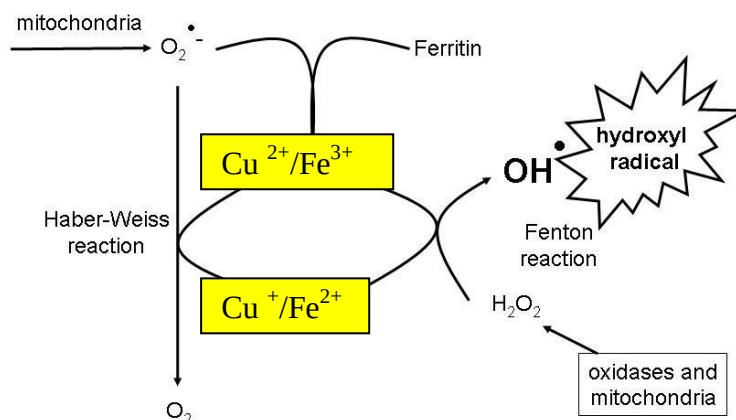


1. ábra: A sejtek redox egyensúlyának megváltozása oxidatív stressz alatt.
(Tuteja és mts. 2010)

1.2.2. A ROF-k képződése réz stressz alatt

Az átmeneti fémek, mint a réz, katalizálják a toxikus hidroxil gyök kialakulását, ami egy nem- enzimatis kémiai reakció révén képződik a szuperoxid gyök és a hidrogén-peroxid között a Haber- Weiss reakció során (Halliwell és Gutteridge 1984) (**2. ábra**). A réz ugyanis képes változtatni oxidációs állapotát; egyszeresen pozitívan töltött formából (Cu^+) kétszeresen töltött kationná (Cu^{2+}) alakul. A Fenton- reakció során a réz elektronfelvétele révén oxidálja a hidrogén-peroxidot (H_2O_2), amely hidroxilgyökké ($\text{OH}^\bullet$) alakul. A keletkezett szabadgyök a legveszélyesebb a reaktív oxigénformák közül, mivel oxidáció révén károsítja a fehérjék és lipidek mellett a nukleinsavak szerkezetét is.

A réz-kezelt *Arabidopsis* gyökerekben a H_2O_2 képződése a Fenton-reakció mellett a szuperoxid dizmutációjával is történhet. A szuperoxid gyökanion termelésében pedig a NADPH-oxidázok játszanak szerepet réz stressz alatt (Opdenakker és mts. 2012).



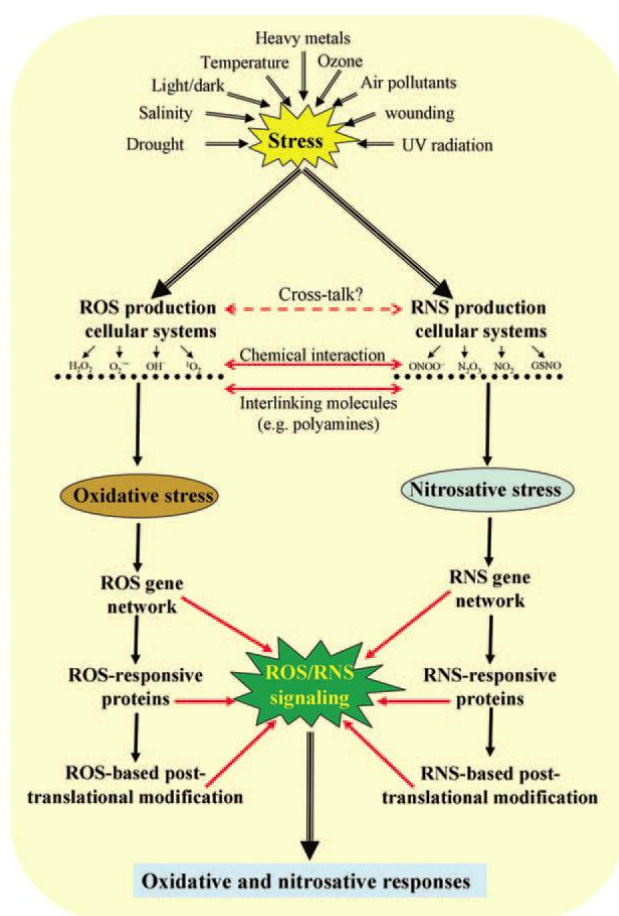
2. ábra: A réz szerepe a Haber-Weiss/Fenton reakcióban

A réz többlet oxidatív stresszhez vezet, ami megváltoztatja az enzimatisz antioxiidánsok aktivitását, így az aszkorbát peroxidáznak (APX), kataláznak (CAT), a dehidroaszkorbát reduktáznak (DHAR), guajakol-peroxidáz, glutation reduktáz (GR), monodehidroaszkorbát reduktáz (MDHAR) és a szuperoxid dizmutáz (SOD) (De Vos és mts 1992; Wang és mts 2004; Lombardi és Sebastiani 2005). Az aszkorbát-glutacion ciklus részt is vesz a réz többlet indukálta válaszreakciók kialakításában (Gupta és mts. 1999; Drakiewicz és mts. 2003). Az antioxiidáns válaszok levélben és gyökérben függenek a réz többlet mértékétől, időtartamától, a növény fajtól és ökotípusától.

A növények nehézfém toleranciájának jobb megismerése érdekében fontos ismereteket gyűjteni a réz által kiváltott génexpressziós változásokról is. Weber és mts. (2006) által elvégzett transzkriptom analízis során fény derült arra, hogy a réz-válasz gének többségének kifejeződését más abiotikus stresszek (pl. ózon, só, hideg) is modulálják. Ennek oka feltehetőleg az, hogy a réz többlet indukálja a ROF-ok nagymértékű képződését, ami más stresszeknek szintén következménye (Yruela 2009).

1.2.3. A ROF-k szerepei a nehézfém stressz során

A ROF megemelkedett szintje a sejt redox egyensúlyának felborulásához, azaz oxidatív stressz kialakulásához vezet (Potters és mts. 2009). Ennek során a membránok, fehérjék és nukleinsavak irreverzibilis károsodást szenvednek, így a sejt elhal. A réz többlet által indukált H_2O_2 szerepelhet jelmolekulaként is, hiszen az OXI1-MAPK kaszkád aktiválásán keresztül szabályozza a pro- (NADPH-oxidáz, lipoxigenáz) illetve antioxidáns (SOD, kataláz) enzimek génexpresszióját (Opdenakker és mts. 2012). A ROF –k nehézfém stressz során betöltött szerepeit a **3. ábra** szemlélteti.



3. ábra: A nehézfém stressz során lejátszódó ROF- jelátvitel sémája
(Molassiotis és Fotopoulos 2012)

1.3. A reaktív nitrogénformák (RNF) és a nitrozatív stressz

1.3.1. A RNF-k fajtái

A reaktív nitrogénformák egy, a növényi és állati sejtekben is előforduló, újszerű molekulacsalád, melyek közé a nitrogén-monoxid (NO), a peroxinitrit (ONOO⁻), az S-nitrozoglutation (GSNO), a dinitrogén-trioxid (N₂O₃) és a dinitrogén-tetroxid (N₂O₄) tartozik (Molassiotis és Fotopoulos 2012).

A nitrogén-monoxid, mint a fő RNF egy biológiailag aktív gázmolekula, mely fontos szabályozó szerepet tölt be a növények különböző abiotikus és biotikus stresszre adott válaszreakcióiban (Xiong 2010). Gáz halmazállapota mellett kis molekulatömegű, töltéssel nem rendelkező molekula, amely ezekből a tulajdonságokból adódóan akadálytalanul képes diffundálni a növényi sejtmembránon, és ennek révén biológiailag aktív jelátviteli molekulaként funkcionálni különböző sejtvédő folyamatokban (Neill és mts. 2002). Szabadgyök természete révén viszont nagyon instabil, és könnyen kapcsolatba lép más molekulákkal, így károsíthatja a membránokat és a makromolekulákat.

1.3.2. A NO képződése a növényi sejtekben

A növényekben két fő bioszintézis útvonalon valósulhat meg a nitrogén-monoxid produkciója, amelyek közül az egyik útvonal az oxigénben szegényebb szövetekben játszódik le, azaz redukzív, a másik az oxigéndúsabb szövetekben megy végbe, azaz oxidatív (Moreau 2009) (**4. ábra**). A redukzív útvonalon képződhet NO enzimatis úton és nem enzimatisan, viszont közös szubsztrátokból, nitrátból (NO₃⁻) és nitritből (NO₂⁻).

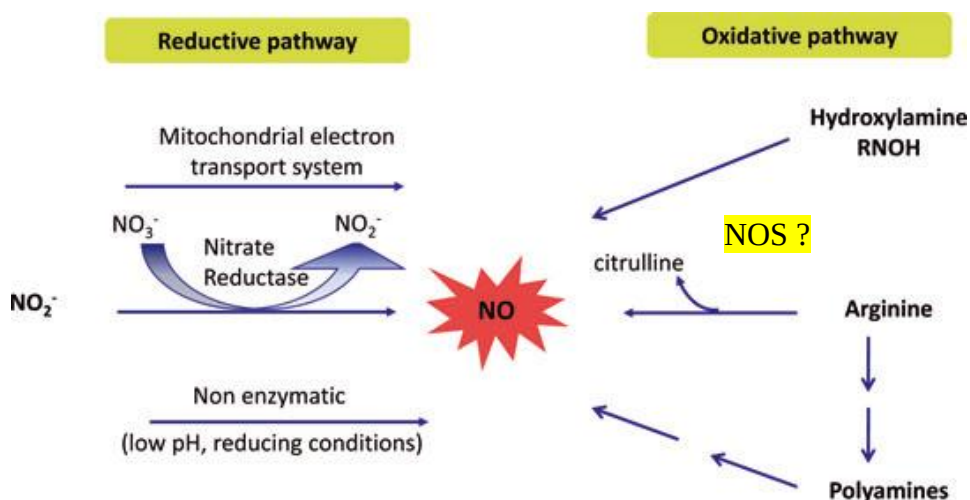
A **nitrát-reduktáz (NR)** enzim elsődleges funkciója a nitrát redukálása nitritté NAD(P)H-függő módon (Crawford 1995). Azonban *in vitro* kísérletek kimutatták, hogy az enzim képes a nitritet tovább redukálni nitrogén-monoxiddá (Rockel és mts. 2002), hatékonysága viszont alacsony; elsősorban oxigénhiányos környezetben jön létre, amikor az enzim elsődleges szubsztrátjából kevesebb van jelen. A NR nitrogén-monoxid szintézisben betöltött szerepét több tanulmány is bizonyította, többek között abiotikus stressz kiváltotta válaszreakciókban, valamint fejlődési folyamatokban, így laterális gyökérindukció során (Kolbert és mts. 2008, 2010).

A nitrogén-monoxid másik enzimatisz képződési útvonala a növényi sejtmembránhoz kötött **nitrit: NO reduktáz** általi út, amelyet dohányban mutatott ki Stöhr és Stremlau (2006). Ez az út vonal szintén az oxigénben kevésbé telített szövetekben következik be, mivel az oxigén az enzimre nézve toxikus (Gupta és mts. 2005).

Nem enzimatisz képződési út vonalainak egyike a nitrit redukciója révén valósul meg, de létrejöhet belőle savas pH-n a gyökér apoplastban is (Bethke és mts. 2004). A **mitokondriális** elektrontranszport során a **végoxidázok** (alternatív oxidáz, citokró-m-c oxidáz) működése révén szintén a nitritből származtatható a nitrogén-monoxid (Planchet és mts. 2005). Ezeken kívül az urea-ciklusban, a xantin eloxidálása során szintén keletkezik NO. A reakciót a **xantin-oxidáz** katalizálja.

Oxidatív úton eddig még csak állati sejtekben bizonyítottak NO szintézist argininből, a **nitrogén-monoxid szintáz** (NOS) katalizálásával. A növényekben eddig még nem sikerült nitrogén-monoxidot közvetlenül szintetizáló enzimet azonosítani. A legújabb eredmények szerint, az *Ostreococcus tauri* nevű alga tartalmaz egy, az állatihoz szerkezetében és működésében is hasonló NOS enzimet (Foresi és mts. 2010).

Nitrogén-monoxid képződhet továbbá spontán oxidáció révén hidroxilaminból (Rumer és mts. 2009), valamint poliaminokból (Tun és mts. 2006). Az utóbbi két folyamat nagyon gyorsan lejár szódik, így valószínűleg direkt szintézisről van szó, viszont egyértelmű bizonyítékok még nem támasztják alá egyik oxidatív szintézis utat sem (Moreau 2010).



4. ábra: A nitrogén-monoxid bioszintézisének két fő út vonala növényekben (Moreau 2010).

1.3.3. A nitrogén-monoxid szerepe nehézfém stressz alatt

A NO az abiotikus stressz toleranciában, így a nehézfémek elleni védelemben is fontos szerepet játszik. Kopyra és mts. 2003-ban azt tapasztalták, hogy a külső forrásból származó NO (külső forrás: nátrium-nitroprusszid (SNP)) jótékony hatású a nehézfémek okozta csökkent gyökérnövekedésre. Az eredmény azt feltételezi, hogy a NO növelte az antioxidánsok aktivitását. Yu és mts. (2005) szintén igazolták a NO réz stresszre gyakorolt enyhítő hatását rizs levelekben, hiszen a külsőleg adott NO csökkentette a ROF szintet. Egy újabb kísérletben pedig az utólag alkalmazott NO kezelés valamelyest visszaállította a csökkent fotoszintetikus működés hatékonyságát réz-kezelt *Chlorella* algákon (Singh és mts. 2004).

Az oxidatív stressz csökkentése mellett a nehézfémek akkumulációjának redukálásában is fontos szerepe van a nitrogén-monoxidnak. Az akkumulációt csökkentő mechanizmusok egyike során a NO nehézfém megnöveli a sejtfalban a kallóz szintet, valamint a pektin és hemicellulóz szinteket, amelyek poligalakturonsav tartalmukból adódóan megkötik a fémeket, elzárva így azt a sejtek érzékenyebb régiójától, a citoszoltól. A sejtfal tehát nehézfém raktárként funkcionálhat stressz esetén (Ernst és mts. 1992).

A nitrogén-monoxid másik fém szintet csökkentő stratégiája a vakuólumban való kompartmentalizálás metallotioeninekhez és fitokelatinokhoz kötött állapotban. Végző alternatívaként a sztómák záródását indukálja, ezáltal csökken a transzspiráció, gátlódik a fémek transzlokációja a gyökerekből a szenzitívebb hajtásba (Mata és mts. 2001).

A nitrogén-monoxid képes a nehézfém stressz toleranciát növelő gének expressziójának indukálására is (Grün és mts. 2006). Az egyik legfontosabb antioxidáns, a glutation génexpressziójának stimulálása által kétféle útvonalon is csökkenteni tudja a nehézfém stresszt. Egyrészt a glutation antioxidáns természete révén közvetlenül, másrészt a fémmegkötő tulajdonságáról ismert fitokelatinok prekursoraként közvetve. A ferritin génexpresszióját szintén pozitívan befolyásolva, segíti a vas homeosztázis helyreállítását.

Mindezekon felül más másodlagos messengerek, például az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját megemelve további génexpressziós változások elindításához járul hozzá.

Réz stressz során a szervek auxin homeosztázisa megváltozik, és ebben a folyamatban a NO, mint szabályozó molekula szerepel (Pető és mts. 2011). A NO képes egy optimális auxin szint fenntartására a réz terhelt növényekben az IES-oxidáz gátlása révén (Xu 2010).

1.4. A prolin, mint multifunkcionális aminosav

1.4.1. A prolin felhalmozódása

A prolin egy, a sejtek anyagcsere folyamataiban jelentős szerepet játszó, rendkívül stabil, ciklikus szerkezetű aminosav. A növényi sejtekben funkcionál az elsődleges metabolizmusban szintetizálódó fehérjék alkotóelemeiként (kötött aminosav), valamint környezeti stressz során akkumulálódó, a toleranciát növelő kompatibilis ozmotikumként (szabad aminosav) (Sleator és Hill 2002).

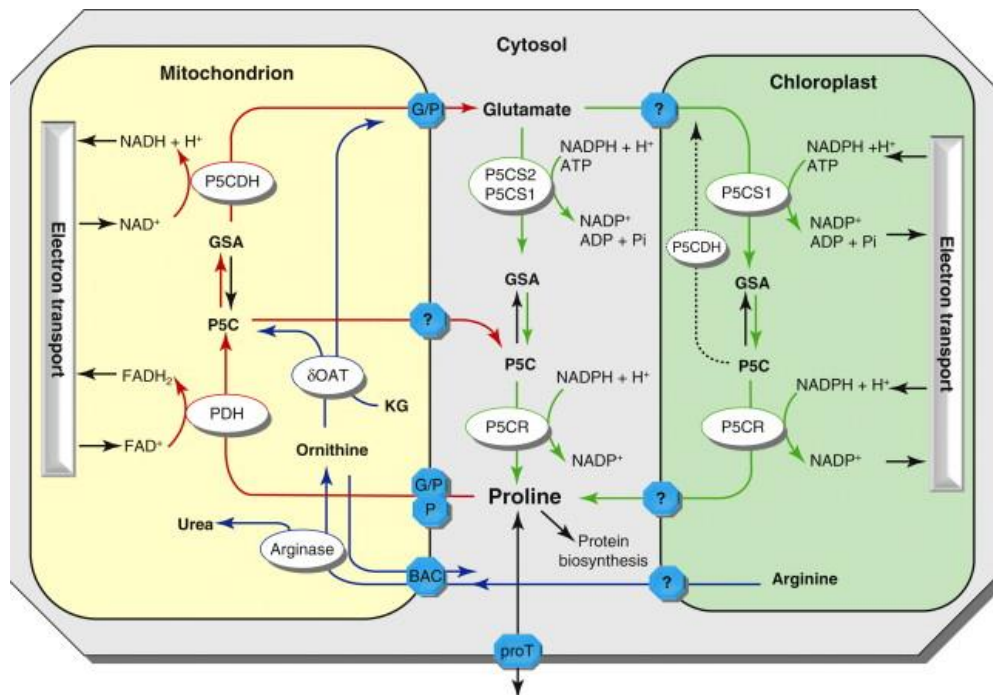
A prolin felhalmozódása szintézisének növelésével és degradációjának csökkenésével alakul ki (Costa és Morel 1994). A bioszintézise és lebomlása egy ciklikus folyamat révén valósul meg a citoplazma és a mitokondrium között. A prolin-P5C ciklust nemrégiben írták le, miszerint a pirrolin-5-karboxilát (P5C) a mitokondriumban keletkezik prolinból, majd transzportálódik a citoszolba és prolinná redukálódik (Miller 2009).

A prolin bioszintézis két prekursorból indulhat ki, a glutamátból és az ornitinből. A növényekben elsősorban glutamátból szintetizálódik prolin, a pirollin-5-karboxilát intermediereken keresztül a citoplazmában. A kiindulási glutamátot a pirollin-5 karboxilát szintáz (P5CS) redukálja glutamát szemialdehiddé, amely spontán átalakul pirollin-5-karboxiláttá (Savouré és mts. 1995), majd a keletkezett termék prolinná redukálódik a P5C-reduktáz (P5CR) katalizálása által (Szoke 1992).

A prolin másik prekursora az ornitin. Ez a szintézis útvonal egyes fajokban a stressz indukálta prolin szintézisnél fontos lehet (Xue és mts 2009). A szintézist az ornitin-delta-aminotranszferáz (OAT) katalizálja, és a reakció szintén a citoplazmában történik.

A prolin szintézise két gén által szabályozott, ezek egyike a merisztémákban és hiperszenzitív reakció során aktív háztartási gén, a *P5CS2*, valamint egy stressz folyamatok (ozmotikus-és a só stressz) által indukált gén a *P5CS1*, amely expresszióját a H_2O_2 -közvetítette jelátvitel is aktiválja (Verslues és mts. 2007).

A prolin lebontása a mitokondriumban megy végbe. A prolin-oxidáz (POX) vagy a prolin-dehidrogenáz (PDH) működése révén újra a P5C intermediere alakul ki, ami a P5C-dehidrogenáz (*P5CDH*) által visszaalakul glutamáttá. A prolin metabolizmusát az **5. ábra** foglalja össze.



5. ábra: Prolin bioszintézis és lebontási útvonalak (Szabados 2010)

A zöld nyilak a glutamátból, míg a kék az ornitiből kiinduló szintézis utat jelölik.

A lebontást a pirossal jelölt útvonal mutatja be. A kék nyolcszögek pedig prolin és glutamát transzporter fehérjéket jelölnek.

A réz indukálta prolin akkumuláció hátterében is a metabolizmust szabályozó enzimek aktivitásának megváltozása áll. Rizs növények levelében a réz kezelés fokozta a prolin szintézisben szereplő P5CR és OAT enzimek aktivitását, míg a prolin lebontásért felelős P5CDH aktivitása csökkent (Chen és mts. 2001). Zhang és mts. (2008) munkája szerint a *Chlamidomonas reinhardtii* nevű zöld alga sejtjeiben a réz kezelés fokozta a P5CS enzim aktivitását és a gén expresszióját.

1.4.2. A prolin szabályzó szerepei nehézfém stressz során

A nehézfémek okozta stressz következményeként a növényi sejtek ozmotikus egyensúlya felborul (Barcelo és Poschenrieder 1990), vízhiány lép fel. A növények általános válaszreakciója a vízháztartás helyreállítása, amelyben fontos szerepe van a prolin akkumulációjának (Schat és mts. 1997). Réz stressz alatt a prolin sztóma záródást idéz elő, ezáltal részt vesz a növényi sejtek ozmoregulációjában (Rajagopal 1981). A zárt állapotú gázcserenyílások révén megszűnik a transzspiráció, ami gátolja a réz transzlokációját a gyökérből a hajtásba, védve ezáltal a fotoszintézis helyét.

A réz akkumulációjának csökkentése mellett a prolin jelentős feladatot lát el a makromolekulák védelmében. Ezt a védő funkciót kétféleképpen éri el, egyrészt, kompatibilis ozmotikumként segíti a molekulák térszerkezetének megtartását stressz alatt, másrészt szabad fémionokhoz hozzákapcsolódva csökkenti az enzim-fém komplex kialakulásának esélyét, amely a fehérje funkciójának elvesztését jelentheti (Sharma és mts. 1998).

A prolin tehát alapvető fontossággal bír a stressz tolerancia kialakításában. Az ozmoprotektív szerepét már számos kísérlet bebizonyította (Kishor és mts. 2005; Verbruggen 2008). A magasabb prolin koncentráció jelenlétében csökkent a *Chlorella* sejtek réz felvételének mértéke (Wu és mts. 1998).

A prolin akkumuláció mértéke különböző növényfajokban eltérő, így a tűrőképesség kialakulása, intenzitása is más. Egyes kutatók azt vélik, hogy a prolin akkumuláció akár adaptációs válaszreakció is lehet a megváltozott környezeti feltételekre. A feltevést alátámasztja, hogy a rézet hiperakkumuláló *Silene vulgaris* nagyobb mennyiségű prolint halmoz fel stressz mentes körülmények között, mint a rézre szenzitív fajtársai (Schat és mts. 1997).

1.4.3. A prolin és a reaktív jelmolekulák (ROF és RNF) kapcsolata

A prolin antioxidánsként is hozzájárul a réz terhelés okozta stressz enyhítéséhez, mivel képes kapcsolatba lépni egyes reaktív oxigénformákkal, mint például a hidroxil gyökkel. A reakció eredményeként egy kevésbé reaktív, prolin-nitroxil gyök alakul ki (Floyd és Nagy 1984). A hidroxil gyök mellett szinglet oxigént kioltó szerepét is tapasztalták (Alia és mts. 2001).

A ROF-kat kioltó és ezáltal az oxidatív stresszt enyhítő hatását számos kísérlet igazolta: exogén prolinnal kezelt *Chlorella vulgaris* esetében csökkent a lipidperoxidáció mértéke (Mehta és Gaur 1999). Bačkor és mts. (2004) szintén pozitív korrelációt tapasztaltak a szabad prolin koncentráció és réztolerancia között *Trebouxia erici*-ben. Prolinnal előkezelt, majd réz stressznek kitett *Scenedesmus*-ban csökkent a lipidperoxidáció és a kálium kiáramlás mértéke a csak rézzel terhelt algapopulációhoz képest (Tripathi és Gaur 2004). A szerzők további eredményei arra engednek következtetni, hogy a károsodást csökkentő hatásért a prolin ROF-kioltó tulajdonsága, nem pedig a fémmegkötő képessége a felelős.

A prolin és a NO kapcsolatát Zhang és mts. (2008) vizsgálta először rézzel kezelt *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben. Azt tapasztalták, hogy a réz terhelés indukálta prolin felhalmozódás a NO donor, SNP hatására fokozódott, míg a NO-t kioltó vegyület (cPTIO) jelenlétében elmaradt. Ugyanezt a jelenséget tapasztalták a P5CS enzim aktivitásának és expressziójának vizsgálatakor is. Ezekből arra következtettek, hogy a réz indukálta prolin akkumuláció a NO által szabályozott. Tapasztaltak továbbá exogén NO által kiváltott prolin akkumulációt alumínium terhelés alatt búzában (Zhang és mts. 2008), valamint kadmium okozta stressz esetén lucernában (Xu és mts. 2010). A legújabb eredmények szerint, az exogén NO kezelés fokozta a P5CS enzim aktivitását és a génexpressziót, valamint prolin felhalmozódást okozott lucerna levelében (Filippou és mts. 2012).

A prolin szintén pozitív hatással van a NO akkumulációra, azáltal, hogy saperonként segíti megtartani stressz alatt a nitrát reduktáz térszerkezetét (Sharma és Dubey 2005), ami a növényekben a nitrogén-monoxid szintézisében kulcsfontosságú enzim.

2. CÉLKITŰZÉS

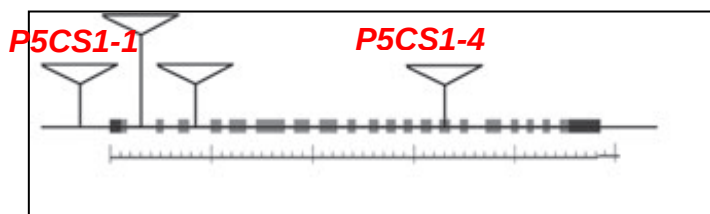
A nitrogén-monoxid és a prolin réz stressz alatt lejátszódó sejtvédő folyamatokban külön-külön betöltött szerepéről már több publikáció született, bár ezekben a mechanizmusokban a két molekula közt kialakuló interakció meglétéről és milyenségéről keveset tudunk magasabbrendű növényekben. Prolint *de novo* nem szintetizáló mutáns növényekben a réz terhelés hatását eddig még nem vizsgálták, így munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A réz kezelés befolyásolja-e a prolin metabolizmusát *Arabidopsis* növényekben?
- A P5CS, mint a prolin bioszintézis egyik kulcsenzime szerepet játszik-e ebben a folyamatban?
- Szükséges-e a prolin akkumuláció a réz tűrés kialakulásához?
- Hogyan hat a prolin hiány a réz stressz által kiváltott hajtás- és gyökérmorfológiai változásokra?
- Hogyan hat a prolin hiány a NO metabolizmusára a réz-kezelt *Arabidopsis* növényekben?
- Hogyan hat a prolin hiány a ROF metabolizmusra a réz-kezelt *Arabidopsis* növényekben?

3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

3.1. Növényi anyag és nevelési körülmények

Kísérleteinket *Arabidopsis thaliana* L. növényekkel végeztük és a vad típus (*Col-0*) mellett két inszerciós mutáns (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) vizsgálatát is elvégeztük. Mindkettő *Agrobaktérium* fertőzés által létrehozott, T-DNS inszerciós mutagenézis eredménye, amely során a prolin bioszintézis kulcsenzimébe, a *pirollin-5-karboxilát szintázt* (*p5cs*) kódoló két gén egyikébe (P5CS1) integrálódott DNS szekvencia, gátolja az enzimet kódoló gén átíródását. A mutánsok az inszerció lokalizációja alapján különíthetők el egymástól, a *p5cs1-1* esetében a T-DNS integrálódása egy 5'-végi UTR régiót érintett, míg a *p5cs1-4* mutáns, prolint kódoló génjének végső exonjába épült be az idegen szekvencia (**6. ábra**). Géntermék, azaz prolin *de novo* szintézissel csak a *p5cs1-1* mutánsban képződik, de a vad típushoz képest nagyon kis mennyiségben. Ezek a mutánsok normál körülmények között nem mutatnak morfológiai eltérést a vad típustól, prolin tartalmuk viszont alapállapotban is 15-30 %-al kevesebb, míg só stressz alatt ez a különbség fokozódik. A mutánsok só stressz hatására érzékenyebben reagálnak, amely az erősebb gyökérmegnyúlás gátlásában, a szövetek magasabb ROF szintjében, valamint a prolin akkumuláció elmaradásában nyilvánult meg (Székely és mts. 2008).



6. ábra: Az általunk felhasznált két mutáns, *pirollin-5-karboxilát szintázt* kódoló két gén egyikében (*p5cs1*) végrehajtott T-DNS inszerció, lokalizációja szerint (Székely és mts 2008).

A növényeket hidropónikus rendszerben neveltük négy hétig, amely növénynevelő kamrában (Fitoclima S600 PLH- típusú) elhelyezett Hoagland tápoldatot tartalmazó 1500 ml-es dobozokból állt (**7. ábra**). A kamrában a növények nappali periódusa 14 órán át tartott, 25 fokon, 65 %-os páratartalom mellett, míg az éjjeli időszak 10 órás volt, eközben a hőmérséklet 20 fokra hűlt, a páratartalom pedig mindössze 50 %-os volt.

A növények rögzítésére (ültető közegként) Eppendorf-csövekbe töltött agart használtunk, és a tápoldatot hetente egyszer lecseréltünk. Az ültetéshez a magokat sterilizáltuk, amelyhez 70 (v/v)%-os etanolt és 50 (v/v)%-os hipót használtunk. A magokat pipetta segítségével ültettük ki.



7. ábra: Az általunk alkalmazott vízkultúrák rendszer

A vízkultúrák rendszert kísérleteinkhez előnyösnek találtuk, mivel a tápoldatban a gyökerek könnyen kezelhetőek maradtak, amely az általunk alkalmazott fluoreszcens festési eljárásokhoz fontos volt. Nem elhanyagolható emellett a kis helyigény, a kezelés tetszőleges beállíthatósága, amelyek szintén könnyebbé tették a munkát. A hidropónikus kultúrák hátránya viszont a gyakori tápoldat csere és a folyamatos figyelem.

A növényeinket négy hetes korukban kezeltük réz-szulfát (CuSO_4) oldattal, három különböző koncentrációban (1, 2.5 és 5 μM). A kezelés egy hétig tartott, kontrollként Hoagland tápoldatban nőtt növényeket használtunk.

3.2. Morfológiai mérések

A növényi anyag feldolgozása előtt kíváncsiak voltunk a vad típus (*Col-0*) és a mutánsok (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) közötti morfológiai különbségekre különböző rézkoncentrációjú kezelést illetően. A gyökerek és a hajtások friss tömege mellett, meghatároztuk a gyökerek hosszát, valamint a levelek darabszámát. Ezeken kívül természetesen a kezelés hatására megjelenő szimptomákat is feljegyeztük.

3.3. Prolin koncentráció meghatározása

A prolin mennyiségi kimutatása L. S. Bates (1973) módszere alapján történt. A prolin méréshez minimum 100 mg biomásszára volt szükség mintánként. A három növénytípust, a négyféle koncentrációt, külön hajtást és gyökeret tekintve összesen 72 mintával dolgoztunk.

Első lépésként homogenizáltuk a növényi anyagot (külön a hajtást és a gyökeret) dörzsmozsárban, mintánként 500 µl 3 %-os szulfoszalicilsavval, majd a homogenizátumot Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük és centrifugáltuk (6000 rpm, 4 Celsius fok, 20 perc), ezután a felülúszóval dolgoztunk tovább.

Tiszta Eppendorf-csövekbe bemértünk: 100 µl 3 %-os szulfoszalicilsavat, 100 µl felülúszót, 200 µl 96 %-os ecetsavat és végül 200 µl előzőleg elkészített savas ninhidrint (250 mg ninhidrin + 96 %-os ecetsav és 6 M-os foszforsav 60:40 arányú keverékében oldva). Alapos keverés után a mintákat 1 órán át tartó 96 fokos vízfürdőbe helyeztük.

Az inkubáció után a reakcióelegyet extraháltuk 1 ml toluol hozzáadásával, amit alapos vortexelés követett.

A fázisok szétválása után a színes kromofórt (ninhidrin + prolin) a felső fázisból nyertük ki, majd kvarcküvetében spektrofotométerrel (Kontron, Uvikon 930-típusú), 520 nm-en megmértük a minták fényelnyelési maximumát. Végül a kapott OD (optikai denzitás) értékekből kiszámoltuk a prolin koncentrációkat.

3.4. A reaktív nitrogénformák detektálása fluoreszcens mikroszkópiás módszerrel gyökércsúcsokban

Az *in vivo* és *in situ* mikroszkópos technikák segítségével egyszerűen és szelektív módon detektálhatók a reaktív oxigén-és nitrogénformák a növényi sejtekben, szövetekben és szervekben. Alkalmazásuk során lehetőség nyílik a növényi szervezeten belül zajló események nyomon követésére (Kolbert és mts. 2012).

Elsősorban a gyökereink nitrogén-monoxid (NO) tartalmára voltunk kíváncsiak, amelynek kimutatására NO- érzékeny fluoreszcens festéket, a 4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorofluoreszcein diacetátot (DAF-FM DA) használtunk. A gyökereket a 10 μ M-os festékben 30 percig festettük sötétben tartva, majd kétszer átmostuk 10 mM-os pH 7.4-es TRIS/HCl- pufferben (Lehotai és mts. 2012). Ezután kihelyeztük tárgylemezre a növényi mintákat, majd mikroszkóp segítségével folytattuk a kísérletet.

A reaktív nitrogénformák közül a peroxinitrit kimutatására is sor került a 3'-(p-aminofenil) fluoreszcein (APF) festék segítségével. A fluorofórral jelölt gyökérmintákat (1 óra inkubáció 10 μ M festékoldatban) kétszer átmostuk TRIS/HCl- pufferben, végül tárgylemezre kihelyezve azokat szintén fluoreszcencia intenzitást mértünk (Lehotai és mts. 2012).

3.5. Reaktív oxigénformák kimutatása gyökércsúcsokban, fluoreszcens mikroszkópos technikákkal

Kísérleteinkhez fluoreszcens mikroszkópiás módszereket alkalmaztunk. A reaktív oxigénformák (ROF) közül detektáltuk a szuperoxid gyökéanion ($O_2^{\cdot-}$) szintet és a szövetek teljes ROF tartalmát.

Az utóbbi kimutatására 10 μ M-os 2'-7'-dikloro-dihidrofluoreszcein diacetát (H_2DCF -DA) festéket használtunk, amelyben 15 percig, 37 fokon inkubálódtak a gyökereink, majd MES/ KCl-pufferben (10 mM, pH 6.15) mosásra került a sor, amelyet négyszer megismételtünk (Gémes és mts. 2011). Ez a festési módszer a NO kimutatás elve szerint működik, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a fluoroför hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) és szuperoxid gyökéanionnal is képes elreagálni.

A szuperoxid gyökéanion kimutatás dihidroetídium (DHE) festéssel történt (10 μ M, TRIS- pufferben). A növényi mintákat 30 percig, 37 fokon tartottuk, majd kétszer átmostuk TRIS/HCl- pufferben (Pető és mts. 2011).

3.6. Életképesség meghatározása gyökércsúcsokban fluoreszcens mikroszkóp segítségével

A nehézfém kezelés életképességre gyakorolt hatását fluoreszcein diacetáttal (FDA) mutattuk ki, amely az élő sejtek fluoreszcenciájának intenzitásával jellemezhető. A festés 30 percig tartott, szobahőmérsékleten, sötétben, amit két alkalommal MES/ KCl- pufferben (10 mM, pH 6.15) történő mosás követett (Lehotai és mts. 2011).

A különböző festékekkel jelölt mintáink fluoreszcencia intenzitásait a tárgylemezre helyezést követően a Zeiss Axiovert 200 M-típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Jéna, Németország) detektáltuk és a hozzá csatlakoztatott, nagy felbontású CCD kamerával (AxioCam HR, HQ CCD) felvételeket készítettünk. A mikroszkóp 9-es filter szettjét (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-∞ nm) alkalmaztuk a szuperoxid gyökkanion detektálására, míg a többi fluorofór emisszióját a 10-es szűrőkombinációval (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-565 nm) detektáltuk. Minden festés esetében a gyökérminták fluoreszcencia intenzitását a merisztematikus zónában detektáltuk, amelyhez a gyökerekről készült fényképekre, 60 µm vagy 120 µm sugarú kört illesztettünk. A pixel intenzitás értékeket az AxioVision Rel. 4.8-as szoftver felhasználásával mértük meg. A kapott értékek által vált jellemezhetővé a detektálandó molekula, vagy tulajdonság.

3.7. Statisztikai analízis

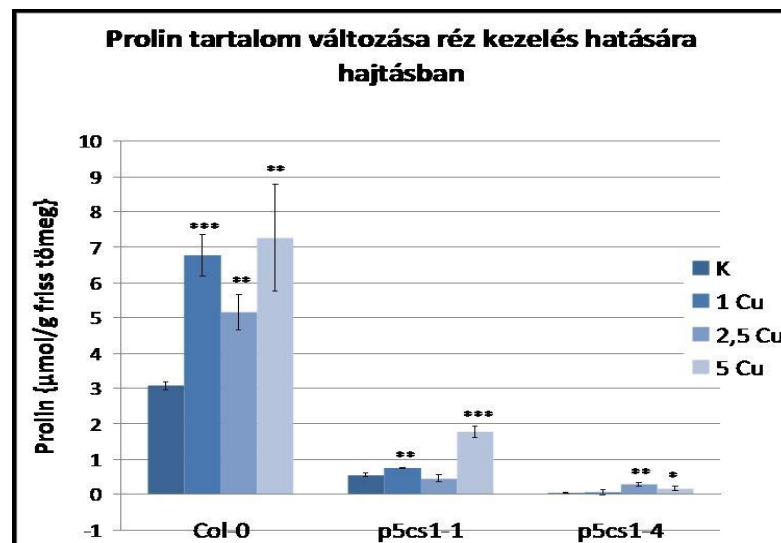
Az eredményeink statisztikai elemzését Student-féle t-próbával végeztük, Microsoft Excel szoftver felhasználásával. A szignifikáns különbségeket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük a diagramokon, a szignifikancia szinteknek megfelelően.

(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

4.1. Prolin koncentráció változása réz-kezelt *Arabidopsis*ban

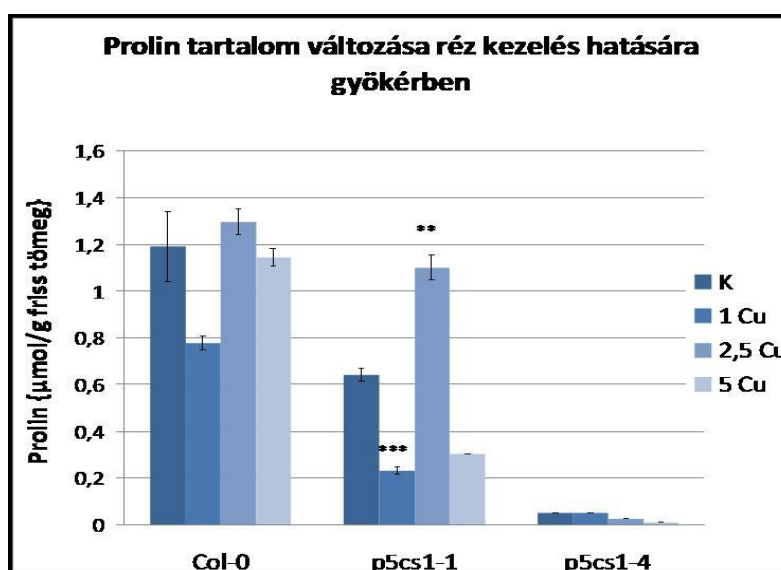
A **hajtás prolin szintjét** vizsgálva a kontroll növények között eltérést figyeltünk meg, hiszen a *p5cs1-1* és *p5cs1-4* mutáns hajtásában lényegesen alacsonyabb a prolin koncentrációja a vad típushoz képest. Az 1 μM -os réz kezelés hatására a vad típusban jelentősen megemelkedett a hajtás prolin tartalma, míg a mutánsokban a kontrollhoz képest ugyan szignifikáns volt az eltérés, de a vad típushoz viszonyítva ez a változás sokkal kisebb mértékű volt. A 2,5 μM -os réz kezelés esetén kissé mérsékeltebb, de szignifikáns prolin akkumuláció történt. Az 5 μM Cu hatására mértük a legmagasabb prolin szintet a vad típus esetében. A *p5cs1-1* mutánsban is tapasztaltunk réz-indukált prolin szint növekedést, bár a koncentráció értékek lényegesen alacsonyabbnak bizonyultak, mint a vad típusú hajtásokban. A másik P5CS-enzim hiányos mutáns, a *p5cs1-4* esetén hasonló eredményeket kaptunk, vagyis a réz prolin szintézist indukált a hajtásban, bár a koncentrációk a vad típusú hajtásban mértékének csupán töredékei (8. ábra).



8. ábra: Vad típusú (*Col-0*) és prolin hiányos mutánsok (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) prolin szintjének változása különböző koncentrációjú réz kezelésekre hatására **hajtásban**.

(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

A **gyökérmintákban mért prolin** koncentrációk jóval kisebbek voltak a hajtásban mértékhez képest. Emellett a kezeletlen gyökerek prolin koncentrációit összehasonlítva, azt figyeltük meg, hogy a mutánsokban ez sokkal alacsonyabb a vad típushoz képest. A mutánsok között is különbség adódott kontroll körülmények között, hiszen a *p5cs1-1* gyökerek magasabb prolin szinttel rendelkeztek a *p5cs1-4*-hez képest. A vad típusú növény gyökerében csupán a 2,5 μM réz-szulfát okozott csekély mértékű prolin szint emelkedést, ami a *p5cs1-1* mutánsban is megfigyelhető volt, viszont nem volt tapasztalható a *p5cs1-4* mutánsban. Az általunk alkalmazott legmagasabb réz koncentráció (5 μM) egyik vizsgált növénytípusban sem okozott prolin akkumulációt (**9. ábra**).

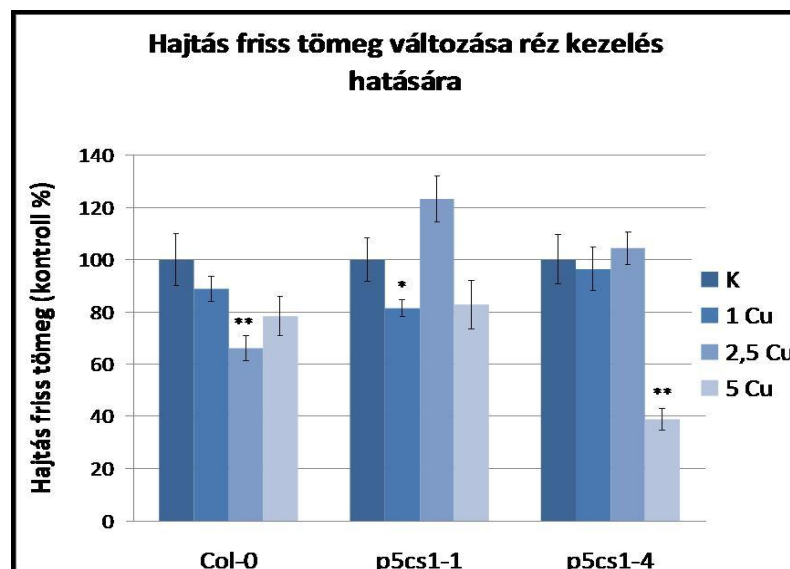


9. ábra: A vizsgált növények prolin szintjének változása különböző koncentrációjú réz kezelésekre hatására **gyökér** szövetekben. (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

4.2. Réz indukálta morfológiai változások összehasonlítása vad típusú és prolin hiányos mutáns *Arabidopsis* növényekben

A vizsgált növények friss tömegének változását először a hajtásban követtük nyomon. A vad típusú növényekben a **hajtás friss tömege** csökkent a különböző koncentrációjú réz kezelések függvényében. A 2,5 μM -os kezelésnél jelentős eltérést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. A prolin hiányos mutánsok esetében a réz kezelés eltérően befolyásolta a hajtások friss tömegének változását.

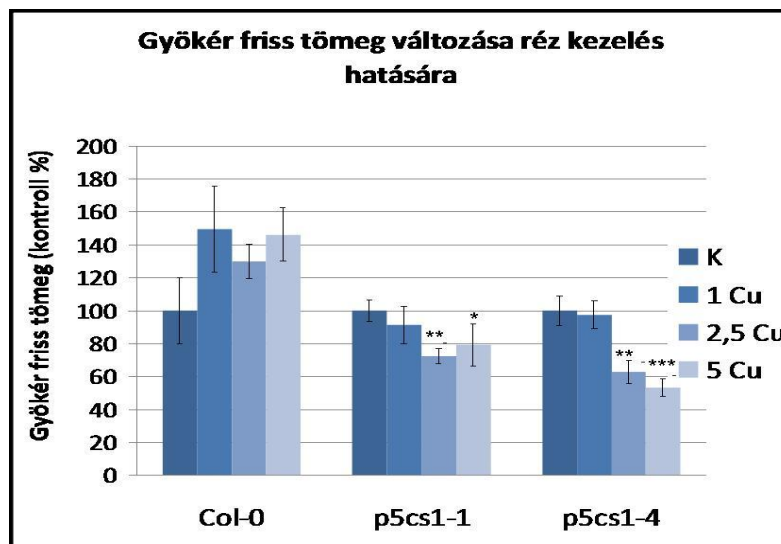
Az 1 és 5 μM -os kezelések csökkentették a hajtások tömegét, viszont a 2,5 μM -os kezelés esetén a változás pozitív irányú volt. A *p5cs1-4* mutánsnál a legnagyobb koncentrációjú kezelés erőteljesebben gátolta a hajtás növekedését, mint a másik két növénytípusban (10. ábra).



10. ábra: A réz kezelés hatása a hajtások friss tömegére vad típusú és prolin hiányos *Arabidopsis*-ban.

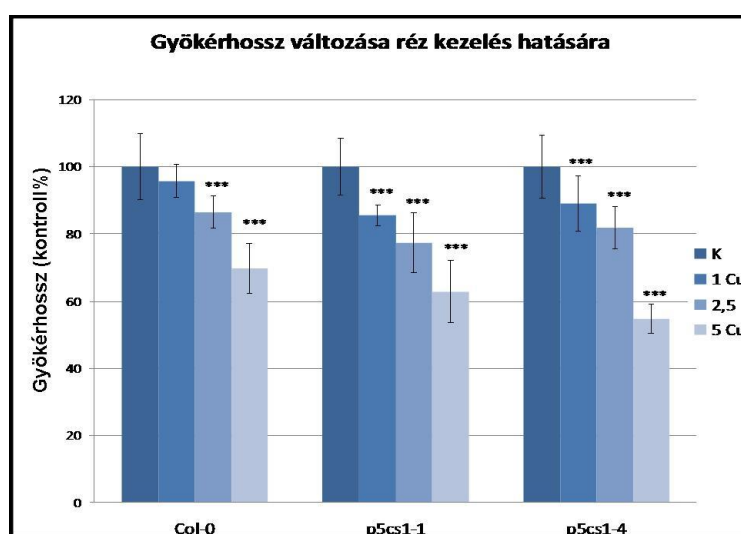
(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

A **gyökerek friss tömegét** tekintve megállapítható, hogy a vad típusú növényre pozitív hatással voltak a kezelések, hiszen a kontrollhoz képest nagyobb friss tömeget mértünk a réz-kezeltekben, bár a változások nem bizonyultak szignifikánsnak. Ezzel szemben a mutánsok esetén a réz kezelések csökkentették a gyökerek friss tömegét. Különösen igaz ez a 2,5 és az 5 μM -os réz kezelésekre, mivel a kontrolltól való eltérés mindkét növénytípusban szignifikáns volt (11. ábra).



11. ábra: Vad típusú (*Col-0*) és prolin hiányos mutáns (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) gyökerek friss tömegének változása különböző réz kezelések hatására. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

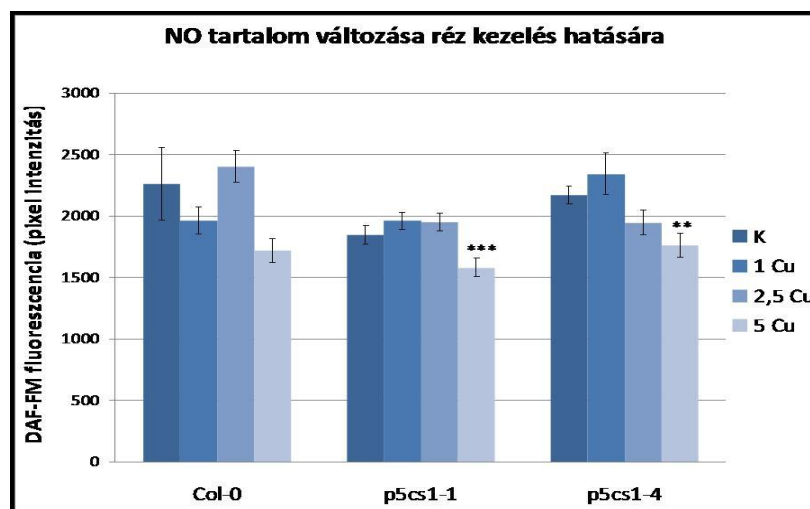
A **gyökerek hosszának** vizsgálata során csökkenő tendenciát figyeltünk meg a kezelt növényekben, mind a vad típusban, mind a mutánsokban. A réz stressz erősségével egyenes arányban csökkent a gyökerek hossza, bár a vad típusú növényekben szignifikáns redukción csak a 2,5 és az 5 μM -os kezelés okozott. A prolint *de novo* nem szintetizáló mutánsok esetében a vad típushoz képest a változás nagyobb mértékben jelentkezett, hiszen ezekben az 1 μM réz-szulfát is szignifikáns növekedési retardációt okozott. A legerősebb megnyúlás gátlást az 5 μM -os kezelés váltotta ki mindhárom növénytípusban. A mutánsok közül a *p5cs1-4* szenvedett el jelentősebb réz-indukált gyökérnövekedés gátlást (**12. ábra**).



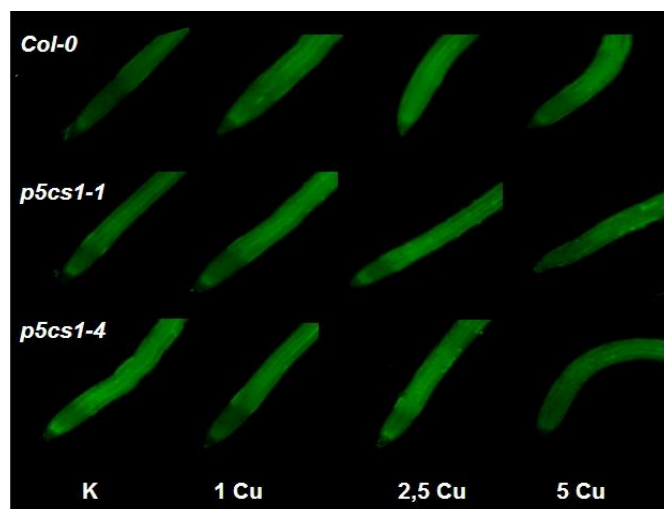
12. ábra: Gyökérhossz változása különböző koncentrációjú réz kezelések hatására, vad típusú (*Col-0*) és prolin bioszintézisben mutáns (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) *Arabidopsis*-ban. (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

4.3. Reaktív nitrogénformák (RNF) keletkezése réz-kezelt *Arabidopsis* gyökércsúcsokban

A gyökércsúcsok **nitrogén-monoxid (NO)** tartalmát jelző, DAF-FM fluoreszcencia detektálása során a kontroll növényekhez viszonyítva tanulmányoztuk a különböző koncentrációjú réz kezelés hatását az általunk vizsgált növénytípusokban. Kontroll állapotban a prolin szintézisben hibás mutánsok gyökércsúcsai alacsonyabb NO tartalommal rendelkeztek, mint a vad típus. Az 1 és a 2,5 μM -os réz kezelés nem okozott szignifikáns változást a NO tartalomban egyik növénytípusban sem. Az 5 μM réz-szulfáttal kezelt gyökérmintákban NO szint csökkenését tapasztaltuk mindhárom növénytípusban, viszont ez a hatás csak a mutánsok esetében volt szignifikáns (13.A/B ábra).

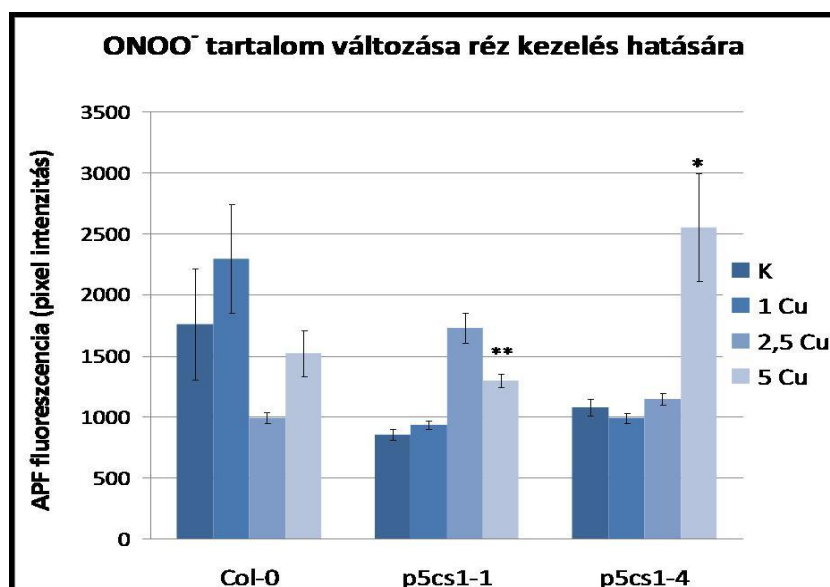


13./A ábra: A NO-kapcsolt fluoreszcencia intenzitás értékei különböző koncentrációjú réz kezelésekre hatására, vad típusú (*Col-0*) és prolin hiányos mutánsok (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*) gyökér merisztémáiban. (** $p \leq 0.01$)



13./B ábra: A NO-specifikus fluorofórral jelölt gyökércsúcsokról készült mikroszkópos felvételek.

A **peroxinitrit (ONOO^-)** tartalom kimutatása során azt tapasztaltuk, hogy a szabad prolint kis mértékben szintetizáló *p5cs1-1* mutáns gyökércsúcsaiban a nagyobb réz koncentrációk indukálták a peroxinitrit szint emelkedését. A másik mutáns, a *p5cs1-4* esetében csupán az 5 μM -os réz kezelés okozott peroxinitrit képződést, viszont ez a hatás igen jelentősnek bizonyult, hiszen mintegy 2,5-szörös ONOO^- -specifikus pixel intenzitás növekedést detektáltunk. Ezekkel ellentétben a vad típusú gyökerekben a réz nem okozott szignifikáns változásokat a peroxinitrit tartalmakban (**14. ábra**).

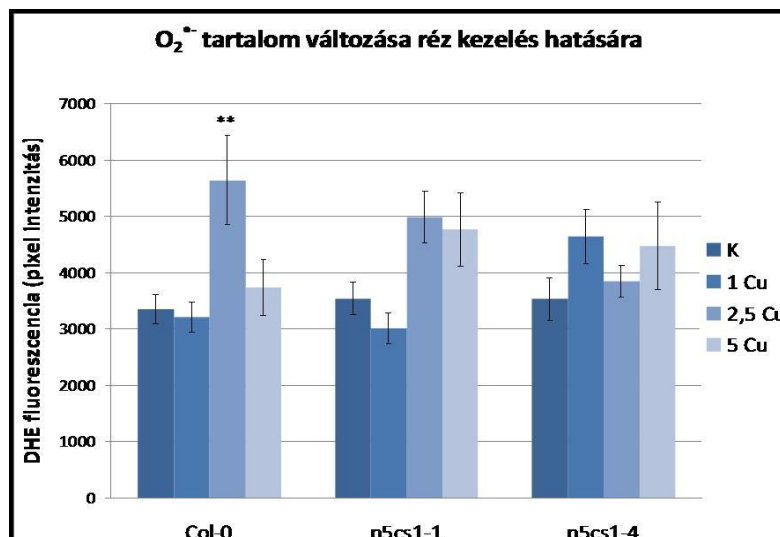


14. ábra: APF fluoreszcencia alapján mért peroxinitrit tartalom változása réz terhelés alatt a vizsgált növényekben (vad típus (*Col-0*) és két prolint nem szintetizáló mutáns (*p5cs1-1* és *p5cs1-4*)).

(** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

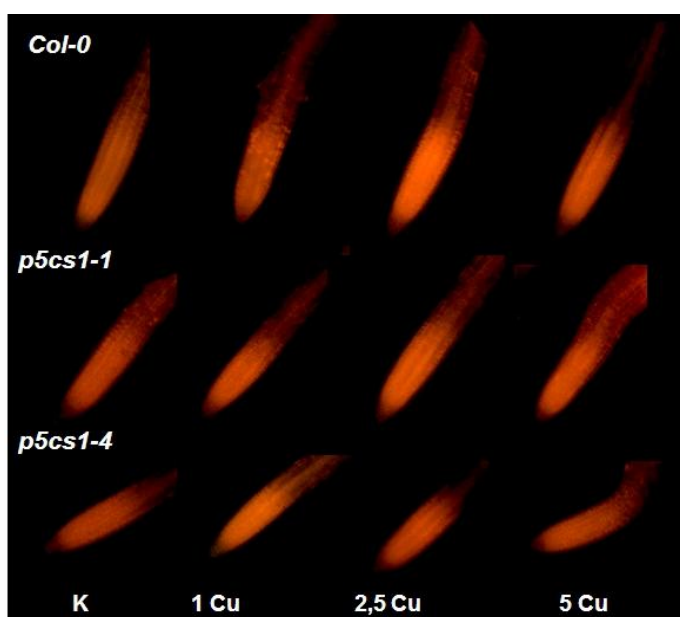
4.4. Reaktív oxigénformák (ROF) képződése réz-kezelt *Arabidopsis* gyökércsúcsokban

A **szuperoxid gyökanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$)** mennyisége a DHE festék fluoreszcenciája alapján mindhárom növénytípusban eltérően változott a kezelések függvényében. A legkisebb koncentrációjú réz kezelés a vad típusban nem volt hatással, a mutánsok szuperoxid tartalmát pedig ellentétesen befolyásolta. A 2,5 és az 5 μM -os kezelés hatására mindhárom növénytípusban egyaránt megemelkedett a $\text{O}_2^{\bullet-}$ mennyiségét jelző fluoreszcencia a kontrollhoz viszonyítva. Az eltérés a *Col-0* esetében volt szignifikáns, így elmondható, hogy a réz jelentősebb hatást fejtett ki a szuperoxid gyökanion szint változására a vad típusban (**15.A/B ábra**).



15./A ábra: A szuperoxid-specifikus DHE fluoreszcencia intenzitás értékei a kontroll és réz-kezelt prolint szintetizáló (*Col-0*) és hiányos növényekben (*p5cs1-1*, *p5cs1-4*).

(** $p \leq 0.01$)

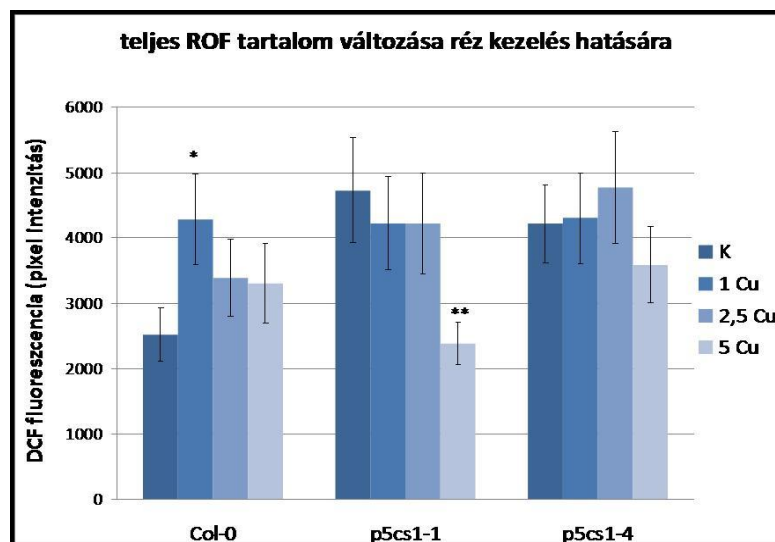


15./B ábra: A DHE fluorofórral jelölt gyökércsúcsokról készült reprezentatív mikroszkópos felvételek.

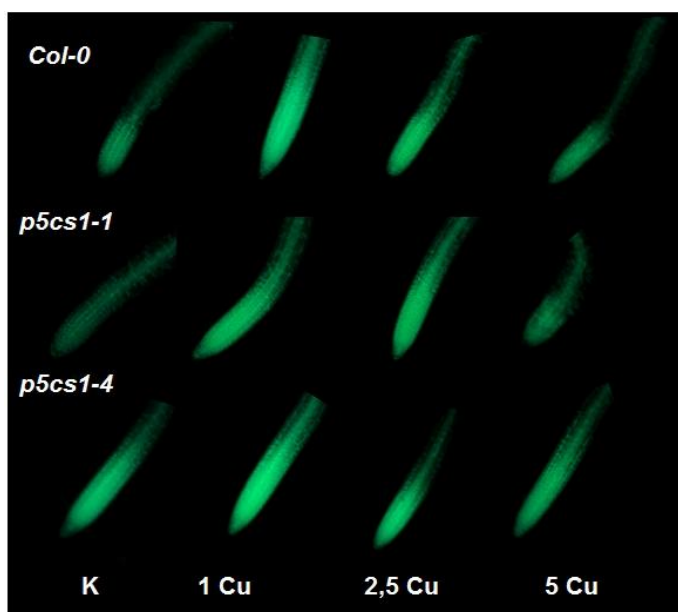
A gyökércsúcsi merisztémák **teljes ROF** tartalmának detektálása során azt tapasztaltuk, hogy kontroll körülmények között a prolín szintézis mutánsok gyökere a vad típusnál magasabb össz ROF szinttel rendelkezik. A *Col-0* gyökerekben minden kezelés esetében növekedett a DCF fluorofór pixel intenzitása a kontrollhoz képest, bár a hatás nem bizonyult réz koncentráció-függőnek.

A *p5cs1-1* mutáns esetében a réz kezelések negatívan befolyásolták az sejtek teljes ROF tartalmát, így a kontrollhoz képest kisebb értékeket kaptunk.

Az eltérés egyedül az 5 μ M-os réz kezelésnél volt jelentős. A *p5cs1-4* mutáns növényekben mért fluoreszcenciát a kisebb koncentrációjú (1 és 2,5 μ M) réz kezelések nem befolyásolták jelentősen. Az 5 μ M réz-szulfát viszont csökkentette a ROF szintet a *p5cs1-4* mutáns gyökércsúcsaiban (16.A/B ábra).



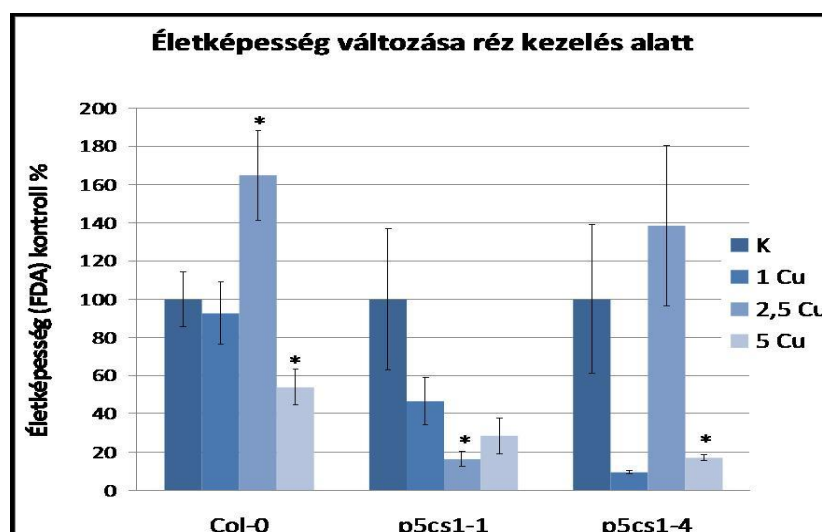
16./A ábra: A DCF fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a vizsgált növények gyökerében különböző koncentrációjú réz kezelések hatására. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)



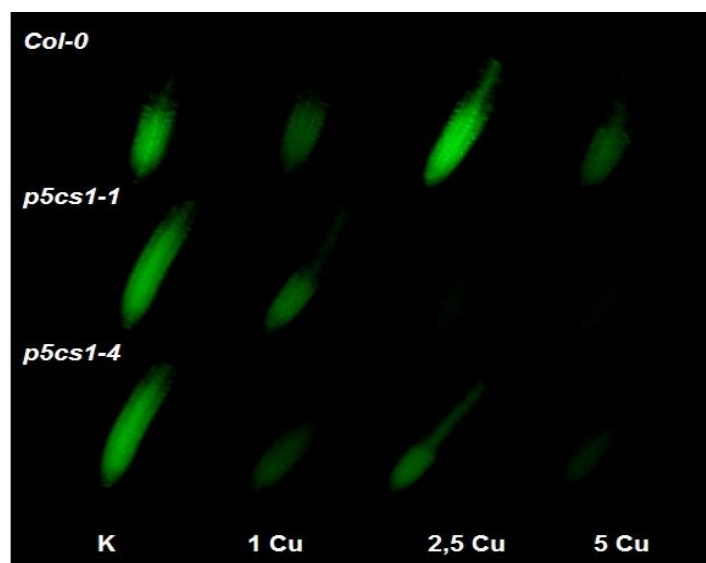
16/B ábra: Teljes ROF tartalmat indikáló festékkel (H_2DCF -DA) jelölt gyökércsúcsokról készített reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek.

4.5. Életképesség változása réz kezelés alatt *Arabidopsis* gyökércsúcsokban

A réz terhelés majdnem minden koncentrációban negatív hatással volt a növények életképességére, amelyet a fluoreszcein festékmolekula pixel intenzitásának csökkenése jelzett a kezelt mintákban. Ez alól kivétel volt az 1 és 2,5 μM rézzel kezelt *Col-0*, hiszen előbbi esetén az életképesség nem változott a kontrollhoz képest, míg az utóbbi esetében érdekes módon jelentősen megemelkedett. Az 5 μM réz-szulfát szignifikánsan csökkentette a vad típusú gyökerek életképességét. A *p5cs1-1* gyökércsúcsokban a sejtek életképessége mindhárom alkalmazott réz koncentráció hatására lecsökkent, míg a *p5cs1-4* mutánsban az 1 és az 5 μM -os kezelés vezetett a sejtek elhalásához (17. A/B ábra).



17./A ábra: A fluoreszcein festékmolekulából származó fluoreszcencia intenzitás értékei (kontroll %-ban megadva) a különböző koncentrációjú rézzel kezelt lúdfű gyökércsúcsi régiójában. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)



17./B ábra: A FDA-val jelölt gyökércsúcsokról készített reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Munkánk során elsőként arra kerestük a választ, hogy a réz kezelés hogyan befolyásolja az általunk vizsgált *Arabidopsis* növények **prolin akkumulációját**. A kísérlethez prolint *de novo* egyáltalán nem (*p5cs1-4*), vagy kis mértékben (*p5cs1-1*) szintetizáló P5CS1 inszerciós mutánsokat használtunk fel, hogy a vad típussal összevetve detektálhassuk a feltételezett stressz indukálta prolin akkumulációt. A prolin tartalom már a kontroll növényekben is eltérő volt, hiszen a *P5CS1* mutánsok alapállapotban is 15-30 %-kal kevesebb szabad prolint tartalmaznak, mint a vad típusú növények (Székely és mts. 2008). Stressz hatására ez az eltérés többszörösére fokozódott, amely a kapott eredmények alapján megfigyelhető, hiszen a prolint *de novo* szintetizálni képes vad típus hajtásában a kezelések hatására jelentősen megemelkedett a prolin koncentráció, míg a mutánsokban ugyan a kontrolltól eltért, viszont a vad típushoz viszonyítva sokkal kisebb mértékű volt a változás (**8. ábra**). Ugyanezekben a mutánsokban, só stressz hatására szintén ezt tapasztalták Székely és munkatársai 2008-ban, viszont az ő esetükben a mutánsokban mért prolin mennyisége kevésbé tért el egymástól. Hasonlóan Hua és mts. (1997) eredményeihez, magas hajtás:gyökér arányt tapasztaltunk a prolin koncentráció tekintetében a lúdfű növényeinkben. Megállapítható továbbá, hogy a vad típusban megemelkedett a prolin szint réz kezelés hatására, míg a mutánsokban kevésbé (*p5cs1-1*), vagy szinte egyáltalán nem (*p5cs1-4*) (**9. ábra**).

Az eredmények alapján elmondható, hogy a P5CS enzim aktivitása kulcsfontosságú a prolin akkumuláció szabályozásában réz stressz alatt az *Arabidopsis* növényekben. Megállapításunkat alátámasztják Zhang és munkatársai (2008) által algákban végzett vizsgálatok, ahol a réz kezelés alatt a *P5CS1* gén expressziója és az enzim aktivitása megnövekedett.

Számos publikációban kapcsolatot figyeltek meg a stressz hatására megnövekedett szabad prolin szint és a stressz tolerancia fokozódása között viszont a kutatók körében megoszlik a vélemény a prolin akkumuláció stressz indukálta válaszreakciókban betöltött szerepéről.

A hajtás-és gyökérrendszer morfológiai vizsgálata során ennek a feltevésnek eredtünk nyomába. Azt tapasztaltuk, hogy prolin hiányában a réz gátló hatása a hajtásfejlődésre kifejezettebbnek bizonyult (**10. A/B ábra**).

Ugyanez mondható el a gyökér növekedéséről is (friss tömeg és hossz), vagyis a prolin hiánya súlyosbítja a réz stressz növekedésre gyakorolt negatív hatását (**11. A/B ábra**). Hasonló eredményekről számolt be Székely és mts. (2008), ahol a nátrium-klorid okozta stressz hatására szintén jelentősebb volt a *p5cs1* mutánsok gyökérmegnyúlásának gátlása a vad típushoz képest. A morfológiai eredmények alapján elmondható, hogy a szabad prolin tartalom csökkenése negatívan befolyásolja a hajtás, valamint a gyökér növekedését, így feltételezhetően **a prolin szerepet játszik a réz tűrés kialakításában *Arabidopsis*-ban**. Ezt támasztja alá Bačkor és mts. (2004) réz toleráns és szenzitív alga törzzsel végzett vizsgálata is, melynek során megállapították, hogy a szabad prolin tartalom pozitív korrelációt mutat réz tűréssel.

A szövetek redox egyensúlyának vizsgálatával szintén arra kerestük a választ, hogy a prolin vajon szerepet játszik a réz tolerancia kialakításában, vagy sem. A reaktív nitrogénformák közül elsősorban a szövetek **nitrogén-monoxid** tartalmát vizsgáltuk. Stressz mentes körülmények között a prolin hiánya csökkent NO tartalmat eredményezett, ami a prolin NO szintet szabályozó szerepére utal. A prolin sáperon funkciója révén, képes stabilizálni a nitrát-reduktáz enzim térszerkezetét (Sharma és Dubey 2005), ezért feltételezzük, hogy ez a mechanizmus hozzájárulhat a NO szint prolin általi regulációjához. A réz kezelés NO tartalomra gyakorolt hatása ellentmondásos, hiszen néhány esetben réz-indukált NO akkumulációt tapasztaltak (Bartha és mts. 2005), míg más kísérleti rendszerben a réz csökkentette a NO szintet (Pető és mts. 2011). Ennek oka az lehet, hogy a nehézfém kezelés koncentrációja, időtartama és körülményei, valamint a növény életkora mind befolyásolják a NO metabolizmusra gyakorolt hatást (Xiong 2010). Saját kísérleteinkben a NO tartalom réz-indukálta csökkenését detektáltuk az *Arabidopsis* gyökércsúcsokban, ami prolin hiányában kifejezettebbnek bizonyult. (**13. A/B ábra**). Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy **a prolin mennyisége szabályozza a NO metabolizmusát réz stressz alatt lúdfű gyökerében**. Ezt az összefüggést elsőként figyeltük meg, így a pontos mechanizmust jelenleg nem ismerjük, és irodalmi adat sem áll rendelkezésre ennek alátámasztására.

Prolin hiányában a nagyfokú réz terhelés **peroxinitrit** képződést okozott, míg normál prolin szintézis esetén ez nem volt megfigyelhető (**14. ábra**). A reaktív oxigénformák közül a **szuperoxid gyökéanion** mennyiségét detektáltuk a gyökércsúcsokban, amely réz-indukált produkciót mutatott prolin hiánya esetén (**15. A/B ábra**).

A prolint csökkent mértékben vagy egyáltalán nem szintetizáló mutánsok magasabb **totál ROF** tartalommal rendelkeznek a vad típushoz képest kontroll állapotban, a kezelés viszont a mutánsok közül csak a *p5cs1-4* mutáns esetében növelte a teljes ROF szintet (**16. A/B ábra**). Szintén a prolin antioxidáns szerepére utal, hogy só stressz hatására az általunk is vizsgált mutánsokban fokozott H_2O_2 felhalmozódást figyeltek meg (Székely és mts. 2008).

A három reaktív molekula (NO , $ONOO^-$ és $O_2^{\cdot-}$) réz-indukált szintbeli változása a legtöbb esetben egymással összefüggő tendenciát mutatott. Ez alapján azt feltételezzük, hogy elégtelen prolin szint esetén a NO reakcióba lép a szuperoxid gyökanionnal létrehozva az erős oxidáló hatásáról ismert peoxinitritet, amely lipidek és fehérjék mellett a DNS molekulát is károsítja. Az így kialakuló nitrozatív stressz a sejtek halálához vezet.

A szabad prolint különböző mértékben előállító növénytípusok életképességét vizsgálva megállapítható, hogy a **prolin hiánya csökkenti a sejtek életképességét réz stressz alatt** (**17. A/B ábra**). A gyökérmerisztéma sejtek életképességének csökkenése pedig a gyökérmegnyúlás erőteljes gátlását okozza.

Eredményeink alapján feltételezhető tehát, hogy a prolin szerepet játszik a réz tolerancia kialakulásában *Arabidopsis thaliana*-ban. Antioxidánsként a peroxinitrit, valamint a reaktív oxigénformák mennyiségének redukálása révén szerepet játszik a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a nitrogén-monoxid és a prolin réz stresszben betöltött szerepét és egymásra gyakorolt hatásának vizsgálatát végeztük el, amelyet korábban csak alacsonyabbrendű növényekben, legfőképp algákban vizsgáltak. Kísérleteink vad típusú és prolin hiányos mutánsok réz terhelésre adott válaszreakcióinak összehasonlítására irányultak. Prolint *de novo* nem szintetizáló mutáns növényekben a réz hatását eddig még nem vizsgálták, így a kapott eredményeinkből elsőként állapíthattuk meg a következőket:

- A réz kezelés indukálta a prolin akkumulációját *Arabidopsis* növényekben.
- A P5CS enzim aktivitása kulcsfontosságú a prolin felhalmozódás szabályozásában réz stressz alatt
- A réz-indukált prolin felhalmozódás hozzájárul a lúdfű növények stressz toleranciájának kialakításához.
- A prolin hiánya súlyosbítja a réz stressz okozta növekedés gátlást a lúdfű hajtás-és gyökérrendszerében.
- A prolin részt vesz a NO metabolizmus regulációjában réz terhelés alatt.
- A prolin szabályozza a reaktív oxigénformák metabolizmusát is, antioxidánsként fenntartva a sejtek redox homeosztázisát.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Alia, Mohanty P, Matysik J.** (2001) Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* **21**, 195–200.
- Asada K, és Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition (Topics in Photosynthesis (Vol. 9) Kyle D.J et al.)*, pp. 227-287, Elsevier
- Backor M, Fahselt D, Wu CT** (2004) Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Science* **167**, 151-157
- Barcelo J, Poschenrieder C.** (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* **13**, 1–37.
- Bartha B, Kolbert Zs és Erdei L.** (2005) Nitric oxide production induced by heavy metal sin *Brasica juncea* L. Czern and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis* **49**, 9-12
- Bates L.S, Waldren R.P, Teare I.D** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**, 205-207
- Bernal M, Ramiro MV, Cases R, Picorel R, Yruela I** (2006b) Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiologia Plantarum* **127**, 312-325
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL** (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**, 332-341
- Carillo-González R, Simunek J, Savué S, Adriano D** (2006) Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advanced Agronomy* **91**, 113-180
- Chen CT, Chen LM,** (2001) Regulation of proline accumulation in detached rise leaves exposed to excess copper. *Plant Science* **160**, 283-290
- Costa G, Morel J-L.** (1994) Water realtions, gas exchange and amino acid content in Cd treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 561-570
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**, 1-11
- Csathó P** (1994) A környezet nehézfém szennyezettsége és az agrártermelés. *Tematikus szakirodalmi szemle, Magyar Tudományos Akadémia Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete*
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-868

De Vos CHR, Vonk MJ, Voojis R, Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* **98**, 853-858

Drazkiewicz M, Skórzynska-Polit E, Krupa Z (2003) Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science* **164**, 195-202

Ernst W, Verkleij J, Schat H. (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* **41**, 229-248

Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V (2012) The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine*

Floyd RA, Nagy ZS. (1984) Formation of long-lived hydroxyl free radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **790**, 94–97.

Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Calo G, Salerno G, Lamattina L. (2010) Characterization of nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* **22**, 3816-3830

Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants, redox biology in a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**, 312-322

Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* **219**, 1-14

Hinsinger P, Courchesne F (2007) Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids at soil-root-interface. In: „*Biophysico-chemical processes of heavy metal and metalloids in soil environments, Vol'1*”(Eds A Violante, PM Huang, GM Gadd) (Wiley-IUPAC Series Biophysico-Chemical processes and Environmental System: Chichester, UK)

Hua X.J, van de Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Developmental Regulation of Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* vol. **114** no. 4 1215-1224

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. *-Physiologia Plantarum* **142**(2): 179-192

Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 507–516

Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (1999) Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **106**, 262-267

Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J Exp. Bot.* **56**, 2601-2609

Kishor K, P.B. et al. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* **88**, 424– 438

Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L. (2008) Osmotic stress and indol-3-butyric acid- induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* **133**, 406-416

Kolbert Zs, Ortega L, Erdei L. (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *Journal of Plant Physiology* **1**, 77-80

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

Kopyra M, Gwózdź E. (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth on *Lupinus luteus*. *Plant Physiol.Biochem.* **41**. 1011-1017

Küpper H, Setliková E, Ferimazova N, Spiller M, Küpper FC (2003) Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Functional Plant Biology* **30**, 1187-1196

Láng F szerk. (1988) Növényélettan: A növényi anyagcsere, ELTE Eötvös kiadó, Budapest

Lehotai N, Kolbert Zs, Pető A, Feigl G, Ördög A, Devanand Kumar, Tari I, Erdei L. (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* **15**, 5677-5687

Lombardi L, Sebastiani L. (2005) Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in Vitro grown plants. *Plant Science* **168**, 797-802

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press, London*, pp 344-346

Mata G.C, Lamattina L. (2001) Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress.

Mehta SK, Gaur JP. (1999) Heavy metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist* **143**, 253–259.

Miller G, et al. (2009) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J. Biol. Chem.* **284**, 26482-26492

Molassiotis A, és Fotopoulos V (2011) Oxidative and nitrosative signaling in plants. *Plant signaling & Behaviour* **6:2**, 210-214

- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, és Klessig D.F** (2010) NO synthesis and signaling in plants- where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**, 372-383
- Neill , S.J. Desikan R., Clarke A. és Hancock J.T** (2002) Hydrogen-peroxid ana nitric oxide as signaling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 388-395
- Opdenakker K, Cuyper A.** (2012) Cadmium and Copper Stress Induce a Cellular Oxidative Challenge Leading to Damage Versus Signalling. *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signalling and Remediation*
- Ötvös E, Pázmándi T, Tuba Z** (2003) First national survey of atmospheric heavy metal deposition in Hungary by the analysis of mosses. *The science of the total Environment* 309:151-160
- Panou- Filotheou H, Basabalidis AM** (2004) Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare subs. hirtum*). *Plant Science* **166**, 1497-1504
- Pastori G. M, és Foyer C.** (2002) Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129**, 460-468
- Patsikka E, Kairavuo M, Sersen F, Aro E-M, Tyystjarvi E** (2002) Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology* **129**, 1251-1260
- Pető A, Lehotai N, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L és Kolbert Zs** (2011) Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Annals of Botany* **108**, 449-457
- Potters G, Pasternak T.P, Guisez Y, Jansen MAK.** (2009) Different stresses, similar morphogenetic responses: integrating a plethora pf pathways. *Plant Cell and Environment* **32**, 158-169
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.* **41**, 732-743
- Puig S, Andres- Colas N, García- Molina A, Penarrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment* **30**, 271-290
- Rajagopal V.** (1981) The influence of exogenous proline onthe stomatal resistance in *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* **52**, 292–296.
- Reichman S. M.** (2002) The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. *Australian Mineral & Energy Environment Foundation*
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *JExp. Bot.* **53**, 103-110

Rumer S, Gupta K.J., Kaiser WM (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *J Exp. Bot.* **60**, 2065-2072

Savouré A, et al. (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5 carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **372**, 13-19

Schat H, Sharma SS, Vooijs R. (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **101**, 477-482.

Singh A. K, Sharma N. (2004) Ecotoxicological Environment Safe **59**, 1011-1017

Sharma SS, Schat H, Vooijs R. (1998) In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* **49**, 1531-1535.

Sharma P. és Dubey R.S. (2005) Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol.* **162**, 854-864

Sleator RD, Hill C (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev.* **26**, 49-71

Stöhr C, és Stremlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp. Bot.* **57**, 463-470

Szabados L, és Saviourá A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trend sin Plant Science Vol 15*.

Székely Gy, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigo G, Zsigmond L, Csiszár J, Ferhan Ayaydin, Strizhox S, Jásik j, Shelczer E, Koncz Cs, Szabados L (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal* **53**, 11-28

Szoke A et al. (1992) Subcellular location of delta 1-pyrroline-5 carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiology*

Taylor, G. J. és Foy, C. D. (1985) Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Canadian Journal of Botany* **63**, 1271-1275

Torres M. A, Dangl J.L (2005) Function of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 397-403

Tripathi BN, Gaur JP. (2004) Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* **219**, 397-404.

Tun N.N, Santa Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* **47**, 346-354

Tuteja N, Gill S.S (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930

Verslues, P.E., Kim, Y.S., and Zhu, J.K. (2007) Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate: glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology* **64**, 205-217

Wang H, Shan X-q, Wen B, Zhang S, Wang Z-j (2004) Responses of antioxidative enzymes to accumulation of copper in a copper hyperaccumulator of *Commoelina communis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**, 185-192

Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell and Environment* **29**, 950-963

Wu J-T, Hsieh M-T, Kow L-C. (1998) Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (*chlorophyceae*) cells. *Journal of Phycology* **34**, 113–117.

Xiong J., Fu G., Tao L., Zhu C. (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **497**, 13-20

Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil*. **326**, 321-330

Xue X, et al. (2009) Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB Rep.* **42**, 28-34

Yruea I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions

Zhang P.I, Mehta S.K, Liu Z.P, és Yang Z.M. (2008) Copper-Induced Proline Synthesis is Associating with Nitric Oxide Generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiology* **49**, 411-419

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irmának, a Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget teremtett számomra dolgozatom elkészítéséhez a tanszéken.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának az elméleti tudás megalapozásában és dolgozatom elkészítésében nyújtott szakmai segítségéért és kedvességéért. Külön köszönöm a munkacsoport PhD hallgatóinak, Lehotai Nórának, Megyeriné Pető Andreának és Feigl Gábornak, akik a különböző kísérleti módszerek elsajátítása mellett mindenben a segítségemre voltak.

Köszönöm továbbá Dr. Szepesi Ágnesnek és Ördög Attilának, akik a munkám technikai részében nyújtottak segítséget.

Végül megköszönném a Tanszék összes dolgozójának, akik valamilyen módon segítettek munkám elvégzésében.

9. NYILATKOZAT

Alulírott Tugyi Nóra kijelentem, hogy a dolgozatomban leírt munkafolyamatok közül:

- a növénynevelést,
- a morfológiai méréseket,
- a prolin mennyiség meghatározását,
- a reaktív nitrogén-és oxigénformák detektálását, valamint az életképesség meghatározását
- és az eredmények statisztikai analízisét végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2012. december 20.