



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

Reaktív oxigénvegyületek a növényvédelemben

TDK dolgozat

Készítette: Czobor Ádám és Hajdinák Péter

Témavezető: Dr. Szarka András



Budapest, 2014

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	4
2	Rövidítések jegyzéke.....	5
3	Irodalmi áttekintés.....	6
3.1	A reaktív oxigénvegyületek és eliminációjuk növényekben.....	6
3.1.1	Általános jellemzés	6
3.1.2	A reaktív oxigénvegyületek keletkezése	7
3.1.2.1	ROS képződés a kloroplasztiszban és a peroxiszómában.....	7
3.1.2.2	ROS képződés a mitokondriumban.....	8
3.1.3	A reaktív oxigénvegyületek eliminációja.....	9
3.1.3.1	Antioxidánsok.....	9
3.1.3.1.1	Nem enzimatisz antiozidánsok.....	9
3.1.3.1.1.1	Az aszkorbinsav.....	9
3.1.3.1.1.2	A glutation	11
3.1.3.1.1.3	Egyéb nem enzimatisz antiozidánsok	12
3.1.3.1.2	Enzimatisz antiozidánsok.....	12
3.1.3.1.3	Az aszkorbát-glutation (FHA) ciklus	13
3.1.3.2	A mitokondriális elektrontranszportlánc szerepe a ROS eliminációban	14
3.1.3.2.1	Az ETC energiapazarló (<i>energy dissipating</i>) komponensei	15
3.1.3.2.1.1	rotenon rezisztens alternatív NAD(P)H dehidrogenázok (ND-k) ...	15
3.1.3.2.1.2	UCP (szétkapcsoló fehérjék, <i>uncoupling proteins</i>)	15
3.1.3.2.1.3	alternatív oxidáz (AOX)	15
3.1.4	A reaktív oxigénvegyületek, mint szignálok.....	16
3.2	A növényi immunválasz.....	17
3.2.1	Általános bemutatás	17
3.2.2	Mintázat és effektor által kiváltott immunitás.....	17
3.3	Harpin fehérjék.....	19
3.3.1	A III-as típusú fehérjeszekréciós rendszer	19
3.3.2	A harpinek hatásai	20
3.3.3	Harpinek a növényvédelemben	20
3.3.4	Kezeléseinkhez használt harpinek és jellemzőik.....	21
4	Célkitűzés.....	22
5	Anyagok és módszerek.....	23
5.1	Sejtfenntartás	23
5.2	A felhasznált fehérjék előállítása és ellenőrzése	24
5.2.1	Az alkalmazott konstrukciók bemutatása.....	24

5.2.2	A fehérje előállításának menete	25
5.2.2.1	A fehérjék termeltetése	25
5.2.2.2	A fehérjék kinyerése és tisztítása	25
5.2.2.2.1	Alkalmazott oldatok	26
5.2.2.2.2	Sejtfeltárás	26
5.2.2.2.3	Az oszlop előkészítése	26
5.2.2.2.4	A fehérje tisztítása	27
5.2.2.2.5	A fehérjeoldatok koncentrációja és puffercsere	27
5.2.3	Az előállított fehérjék ellenőrzése	28
5.2.3.1	A fehérjék mennyiségi meghatározása	28
5.2.3.2	A fehérjék minőségi elemzése	28
5.3	Az <i>in vitro</i> stressz rendszer	30
5.3.1	A növényi sejtek kezelése harpin fehérjékkel	30
5.3.2	Mintavételezés, mintakezelés, mintaelőkészítés	30
5.4	Relatív génexpressziók vizsgálata	31
5.4.1	RNS izolálása és ellenőrzése	31
5.4.2	cDNS szintézise (reverz transzkripció)	32
5.4.3	Real Time PCR kivitelezése	33
5.4.3.1	Felhasznált primerek	33
5.4.3.1.1	Az YLS8 (<i>housekeeping</i>) gén expressziójának mérése	33
5.4.3.1.2	Az AOX1a gén expressziójának mérése	33
5.4.3.1.3	A GLDH gén expressziójának mérése	34
5.4.3.1.4	A VTC2 és VTC5 gének expressziójának mérése	34
5.4.3.2	A reakció paraméterei	35
5.4.4	Az aszkorbát-glutation ciklus (FHA-ciklus) enzimaktivitás mérése	36
5.4.4.1	Extrakció az aszkorbát-glutation ciklusban (FHA-ciklus) résztvevő enzimek aktivitásának meghatározásához	36
5.4.4.2	Aszkorbát peroxidáz (APX) aktivitás meghatározása	36
5.4.4.3	Monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDHAR) aktivitás meghatározása	36
5.4.4.4	Dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) aktivitás meghatározása	37
5.4.4.5	Glutation-reduktáz (GR) aktivitás meghatározása	37
5.4.5	Mitokondrium izolálás és a GLDH enzimaktivitás mérése	38
5.4.5.1	Mitokondrium izolálása <i>A. thaliana</i> szuszpenziós sejt kultúrából	38
5.4.5.1.1	Felhasznált oldatok	38
5.4.5.1.2	A mitokondrium izolálás menete	38
5.4.5.2	A GLDH enzimaktivitás mérése mitokondrium izolátumon	40

5.5	Aszkorbát szint és redox státusz vizsgálata HPLC-vel	41
5.5.1	A HPLC minták előkészítése, normálás.....	41
5.5.2	A HPLC mérés kivitelezése	41
6	Eredmények és értékelésük	42
6.1	A kezelési koncentrációk beállítása	42
6.2	A génexpressziós vizsgálatok eredménye	43
6.2.1	Az AOX génexpresszió vizsgálatának eredményei	43
6.2.2	A GLDH génexpresszió vizsgálatának eredményei	44
6.2.3	A VTC2 és VTC5 génexpressziók vizsgálatának eredményei.....	45
6.3	Az aszkorbát-glutation ciklusban résztvevő enzimek aktivitásvizsgálata.....	47
6.3.1	Aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimaktivitás	47
6.3.2	Monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDHAR) enzimaktivitás.....	48
6.3.3	Dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) enzimaktivitás	49
6.3.4	Glutation-reduktáz (GR) enzimaktivitás	50
6.4	Az aszkorbát-glutation ciklus gyors enzimatiszus válaszreakcióinak igazolása	51
6.5	A GLDH enzimaktivitás vizsgálat eredménye	51
6.6	Az aszkorbát szint és redox státusz vizsgálatának eredményei.....	53
7	Összefoglalás.....	54
8	Irodalomjegyzék.....	57

1 Bevezetés

A reaktív oxigénvegyületek magas reaktivitású, oxigéntartalmú szabadgyökök és molekulák, amelyek a növényi sejtek normál metabolizmusa során is keletkeznek. Kedvezőtlen környezeti hatások által okozott abiotikus, valamint patogének által okozott biotikus stressz során a reaktív oxigénvegyületek termelődése fokozódik.

Biotikus stressz során az egyik legkorábbi sejtválasz az úgynevezett oxidatív kitörés, amely a reaktív oxigénvegyületek szintjének hirtelen emelkedésével jár. Az oxidatív kitörés során keletkező reaktív oxigénvegyületek védelmi szerepe kettős. Akkumulációjuk nagy reaktivitásuknak köszönhetően közvetlenül károsítja a patogént, ezen felül szignálmolekulaként is funkcionálnak, ezáltal részt vehetnek további védekező mechanizmusok beindításában.

A reaktív oxigénvegyületek azonban nem csak a patogént, hanem a termelő sejtet is károsíthatják. Az oxidatív károsodások kivédésére a növényi sejtek enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokat termelnek. A nem enzimatis antioxidánsok közül az egyik legfontosabb az aszkorbinsav, amely közvetlenül, illetve aszkorbát-peroxidázok elektrondonorjaként is részt vehet a reaktív oxigénvegyületek redukciójában.

Munkánk során *Pseudomonas syringae* eredetű, elicitor hatású harpin fehérjékkel biotikus stresszt váltottunk ki *Arabidopsis thaliana* szuszpenziós sejt kultúrákban, majd vizsgáltuk, hogyan változik a sejtekben az aszkorbinsav mennyisége, redox státusza, illetve a szintézisében és regenerációjában részt vevő egyes kulcsenzimek aktivitása és expressziója. Vizsgáltuk továbbá a mitokondrium oxidatív károsodásának megelőzésében kiemelt szerepet játszó alternatív oxidáz enzim génexpressziójának változásait.

A kísérleteink során kapott adatok segíthetnek a növényi válaszreakciók megértésében, ezen keresztül pedig a biopeszticidok hatékonyságának növelésében, amely lehetővé teheti egyes manapság is használatos környezetre káros permetszerek természetes, környezetre ártalmatlan anyagokra való cseréjét.

2 Rövidítések jegyzéke

Amp:	Ampicillin
AOX:	alternatív oxidáz
APX:	aszorbát-peroxidáz
Asc:	aszorbát
DHA:	dehidroaszorbát
DHAR:	dehidroaszorbát-reduktáz
DTT:	ditiotritol
ETC:	<i>electron transport chain</i> , elektrontranszportlánc
ETI:	<i>effector triggered immunity</i> , effektor által kiváltott immunitás
GPX:	glutation-peroxidáz
GR:	glutation-reduktáz
GSH:	glutation
GSSG:	glutation-diszulfid
HPLC:	<i>high-performance liquid chromatography</i> , nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
IPTG:	izopropil- β -D-galakto-piranozid
LB:	Luria Broth médium
MAMP:	<i>microbe-associated molecular patterns</i> , mikrobához kapcsolt molekuláris mintázat
MDHA:	monodehidroaszorbát
MDHAR:	monodehidroaszorbát-reduktáz
MES:	2-(morfolino)-etánszulfonsav
OD ₆₀₀ :	optikai denzitás, 600nm-en mérve
PAGE:	poliakrilamid gélelektroforézis
PAMP:	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , patogénhez kapcsolt molekuláris mintázat
PRR:	<i>pattern recognition receptor</i> , mintázatfelismerő receptor
PTI:	<i>pattern triggered immunity</i> , mintázat által kiváltott immunitás
ROS:	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktív oxigénvegyületek
SOD:	szuperoxid-diszmutáz
UCP:	<i>uncoupling protein</i> , szétkapcsoló fehérje

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A reaktív oxigénvegyületek és eliminációjuk növényekben

3.1.1 Általános jellemzés

A molekuláris oxigén számos biokémiai reakcióban elektronakceptorként vesz részt, így fontos szerepet játszik az aerob élőlények metabolizmusában. Felhasználása azonban veszélyeket is rejt, mivel a növények által felhasznált oxigén közel 1%-ából reaktív oxigénvegyületek (*Reactive Oxygen Species*, ROS) keletkeznek ¹⁻³.

A reaktív oxigénvegyületek oxigéntartalmú molekulák és szabadgyökök, amelyek erősen reaktívak, és ezáltal toxikusak az élőlények számára. Legfontosabb képviselői a szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxilgyök ($OH^{\bullet}$), valamint a szinglet oxigén (1O_2) ^{4,5}.

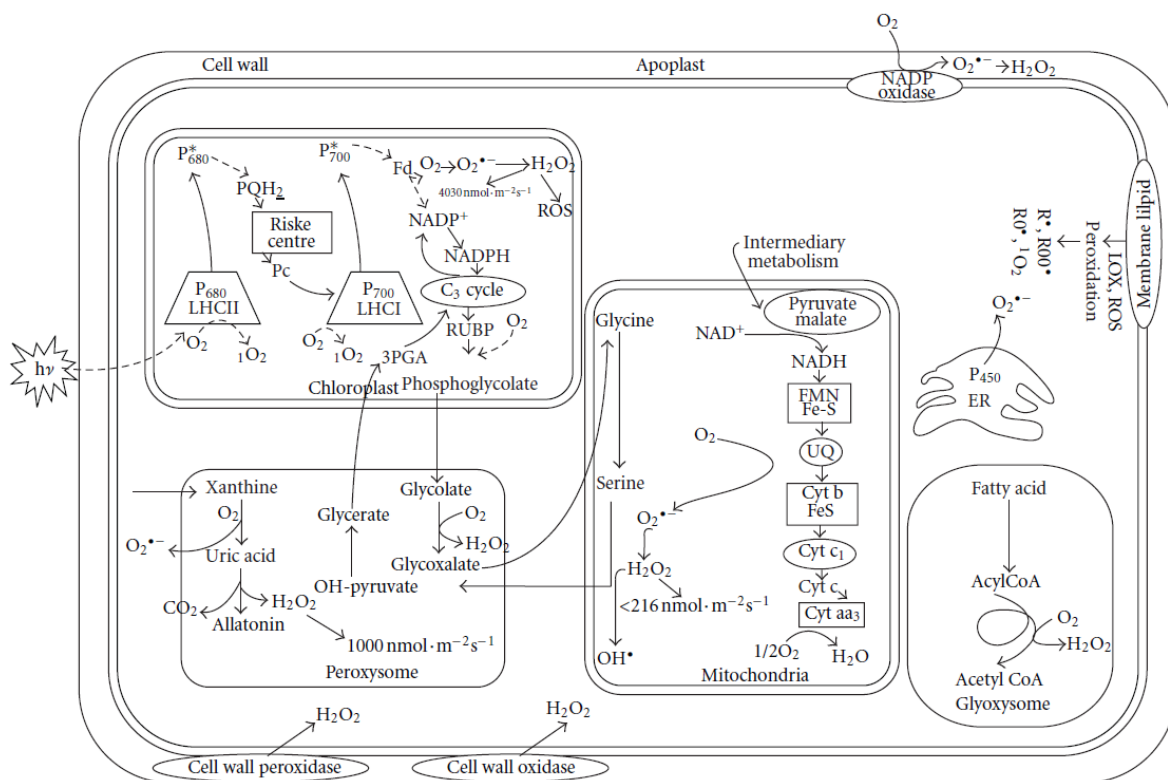
Reaktív oxigénvegyületek keletkezhetnek a növényi sejtek normális működése során, például a fotoszintézis és a glikolízis melléktermékeként, valamint abiotikus és biotikus stressz hatására. Akkumulációjuk oxidatív stresszt okoz a sejtekben, amely során károsodhatnak a sejt fehérjéi, lipidjei, szénhidrátjai, valamint DNS állománya. ^{4,6,7}.

Gyökök	Molekulák
szuperoxid gyök: $O_2^{\bullet-}$	hidrogén-peroxid: H_2O_2
hidroxil gyök: $OH^{\bullet}$	szinglet oxigén: 1O_2
perhidroxil gyök: $HO_2^{\bullet}$	
alkoxi gyök: $RO^{\bullet}$	

1. táblázat: Néhány, a növényi sejtekben keletkező reaktív oxigénvegyület

3.1.2 A reaktív oxigénvegyületek keletkezése

Fotoszintetizáló növényekben világosban a ROS legfőbb forrása a kloroplasztisz és a peroxiszóma, míg sötétben és nem-zöld szövetekben a mitokondrium ⁸⁻¹¹. Ezeken kívül keletkezik ROS az endoplazmatikus retikulumban, a glioxiszómában, a membránlipidek peroxidációjával, a sejtmembránban található NADPH-oxidáz, valamint a sejt falban lévő oxidázok és peroxidázok működése révén is ¹².



1. ábra: ROS források a növényi sejtekben. A ROS fő forrásai a kloroplasztisz, a peroxiszóma és a mitokondrium, de ezeken kívül keletkezik ROS az ER-ben, a glioxiszómában, a membránlipidek peroxidációjával, a sejtmembránban található NADPH-oxidáz, valamint a sejt falban lévő oxidázok és peroxidázok működése révén. ²

3.1.2.1 ROS képződés a kloroplasztiszban és a peroxiszómában

A fotoszintézis során a kloroplasztiszban keletkező oxigént az elektrontranszportláncon áthaladó elektronok képesek részlegesen szuperoxid gyökké redukálni ⁷.

Normális esetben az elektronok a NADP⁺ irányába áramlanak, és redukálják NADPH-vá. Az így keletkező NADPH belép a Calvin-ciklusba, és CO₂ redukciójára fordítódik.

Azonban ha az elektrontranszportlánc túltelítődik, vagy nincs elég NADP⁺ az I. fotorendszerben, akkor az elektronok egy része oxigén redukciójára fordítódik (1. ábra). A reakció során szuperoxid gyök keletkezik (Mehler-reakció), amelyet a kloroplasztiszban található Cu-Zn-szuperoxid-diszmutáz hidrogén-peroxiddá alakít ^{2,13}.

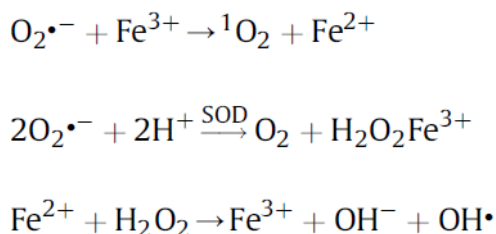
Szuperoxid gyök a peroxiszómák normál metabolizmusa során legalább két helyen keletkezhet (1. ábra). Az első a sejt szerv mátrixában található, ahol a xantin-oxidáz (XO) katalizálja a xantin és hipoxantin oxidációját húgysavvá, a második hely egy kis elektrontranszportlánc (NADH, cyt b) a peroxiszóma membránjában.

Ezen kívül hidrogén-peroxid is keletkezik a peroxiszómákban. Ennek hátterében a zsírsavak β -oxidációja, a flavin- és glikolát-oxidázok működése, valamint a szuperoxid gyök diszproporciója áll ^{1,14}.

3.1.2.2 ROS képződés a mitokondriumban

A mitokondriális elektrontranszportláncban található elektronok elegendő szabadenergiával rendelkeznek a molekuláris oxigén közvetlen redukciójához. Ez a reakció a mitokondriális ROS fő forrása, egyben az aerob légzés elkerülhetetlen velejárója ¹⁰.

ROS képződéséhez az elektrontranszportlánc I-es és III-as komplexénél képződő ubikinon gyök szolgál elektronforrásként (1. ábra). Ekkor a molekuláris oxigén redukciójával szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$) keletkezik. Bár a szuperoxid gyök vizes közegben csak méréskelten reaktív, de azt a szuperoxid-diszmutáz enzim (SOD) képes tovább redukálni hidrogén-peroxiddá. A keletkező H_2O_2 Fe^{2+} -al vagy Cu^+ -nal reakcióba léphet, amelynek terméke az erősen toxikus hidroxil gyök ($OH^{\bullet}$). Ezt a reakciósorozatot Haber-Weiss reakciónak nevezzük (2. ábra).



2. ábra: Haber-Weiss reakció

A reakció során keletkezett hidroxil gyök, csakúgy mint a H_2O_2 , képes áthatolni a membránokon, így a mitokondriumot elhagyni, és a sejtben, valamint magában a mitokondriumban károkat okozni (pl.: lipid peroxidáció) ^{2,7,11}.

3.1.3 A reaktív oxigénvegyületek eliminációja

A reaktív oxigénvegyületek káros hatásainak kivédésére számos komplex mechanizmus áll rendelkezésre a növényi sejtek számára. Ezen komplex mechanizmusokban központi szerep jut az antioxidánsoknak (enzimatis és nem enzimatis), illetve a mitokondriális elektrontranszportlánc energiapazarló (*energy dissipating*) folyamatainak ^{15,16}.

3.1.3.1 Antioxidánsok

3.1.3.1.1 Nem enzimatis antioxidánsok

3.1.3.1.1.1 Az aszkorbinsav

Az aszkorbinsav (C-vitamin) a legbősegebben rendelkezésre álló nem enzimatis antioxidáns a növényi szövetekben, amelyet millimolos koncentrációban találhatunk meg a levelekben és a tároló szervekben ⁷.

Számos biokémiai reakcióban játszik szerepet. Képes közvetlenül reakcióba lépni a szuperoxid és a hidroxil gyökökkel, valamint a szinglet oxigénnel, képes regenerálni az oxidált α -tokoferolt (E-vitamin), amely esszenciális az átmenetifém ionokat tartalmazó enzimek védelmében, ezen felül szubsztrátként szolgál az APX (aszkorbát peroxidáz) enzimatis antioxidáns számára. Az antioxidáns szerepkörön túl számos alapvető sejt szintű folyamat szabályozásában is szerepet játszik, ilyen például a fotoszintézis, a sejtnövekedés és a sejtciklus szabályozása ¹⁷.

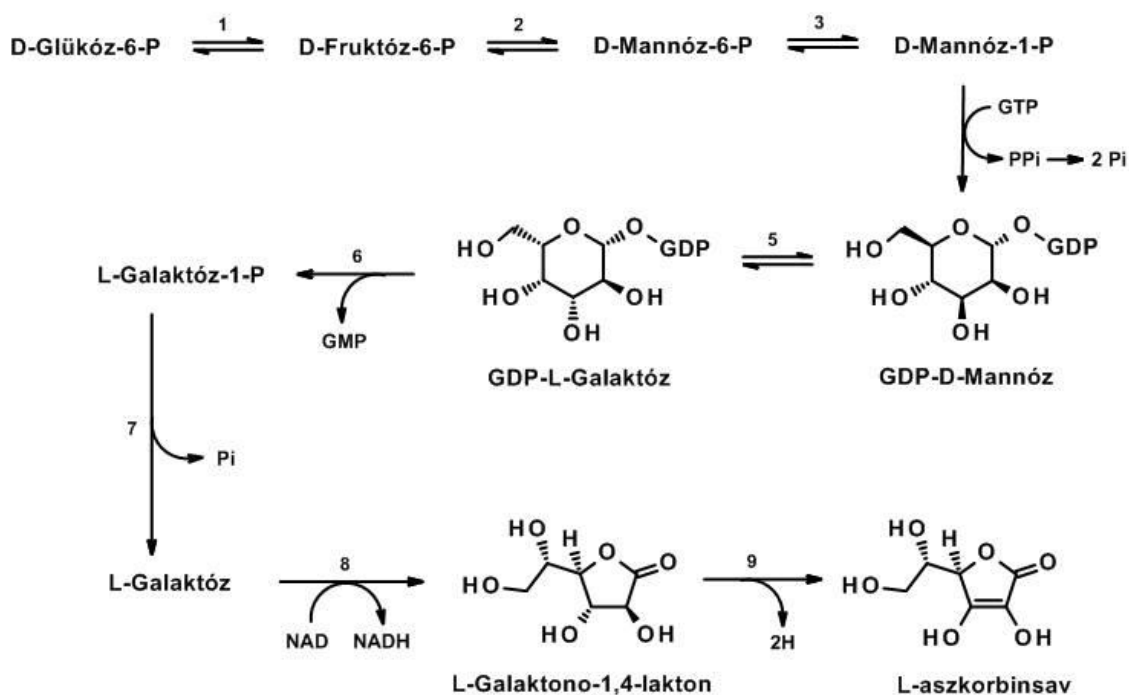
Az aszkorbinsavból egy elektron leadásával monodehidroaszkorbát, két elektron leadásával dehidroaszkorbát keletkezik. A dehidroaszkorbát fiziológiás körölmények közt rövid felezési idejű, így ha azt a sejt nem regenerálja elég gyorsan, akkor a lakton gyűrű hidrolízisével 2,3-diketo-1-gulonsavvá alakul irreverzibilis reakció során ¹⁸.

Az aszkorbát bioszintézise (3. ábra) a citoplazmában kezdődik, majd utolsó lépése a mitokondrium intermembrán terében játszódik le, ahová az L-galaktono-1,4-laktóz diffúzióval kerül. A citoplazmában történő átalakulások egyik kulcsreakciója a GDP-L-galaktoz - L-galaktoz-1P átalakulás, amelyet a GDP-L-galaktoz foszforiláz, más néven VTC2, és közeli homológja, a VTC5, illetve az L-galaktoz guaniltraszferáz képes katalizálni. A VTC2 és VTC5 kettős hiánymutáns növények aszkorbinsav pótlás nélkül növekedési, fejlődési rendellenességeket mutatnak, amelyek aszkorbát, vagy L-galaktoz adagolásával azonnal megszüntethetők ¹⁹. A fent leírt szerepe miatt a VTC2 és VTC5 gének expressziójának vizsgálata kiemelt szerepet kapott munkánk során.

A szintén kulcsfontosságú utolsó lépést katalizáló L-galaktono-1,4-lakton-dehidrogenáz (GLDH) a mitokondrium belső membránjához kötött, működéséhez oxidált citokróm c-t igényel. Bizonyíték a GLDH citokróm c igényére hogy KCN adagolásával, amely blokkolja a citokróm c oxidációját, teljesen gátolható az aszkorbinsav bioszintézise.

Fontos különbség a növényi GLDH és a szintézisre képes állatokban, valamint gombákban található analóg enzimek között, hogy a GLDH nem termel melléktermékként H_2O_2 -t. Ennek hátterében feltehetően a sejt mitokondriális elektrontranszportláncának túloxidálódását megakadályozó folyamatok állhatnak, mivel a mitokondrium kifejezetten érzékeny az oxidatív stresszre^{17,20}.

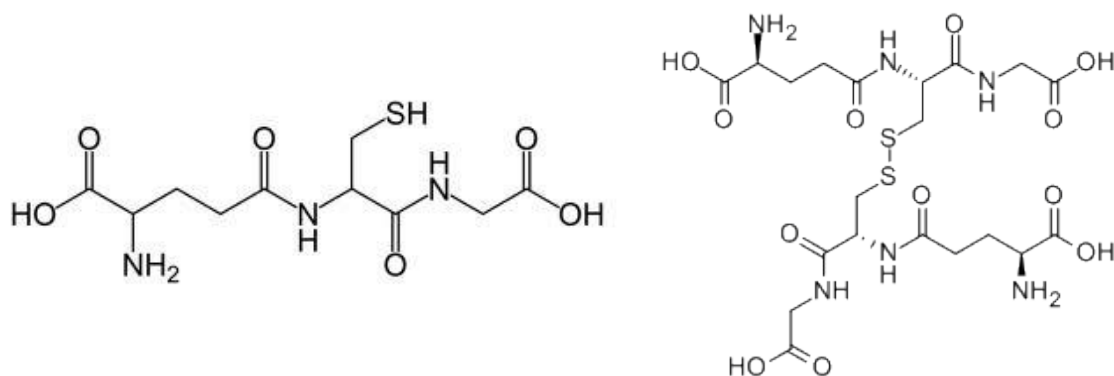
A fentiek miatt a GLDH enzimaktivitásának, illetve génexpressziójának vizsgálata szintén kiemelt szerepet kapott kutatásaink során.



3. ábra: Az aszkorbinsav bioszintézise növényekben – Az átalakítást katalizáló entimek: (1) Hexóz-foszfát izomeráz, (2) Foszfomannóz izomeráz, (3) Foszfomannóz-mutáz, (4) GDP-D-mannóz pirofoszforiláz, (5) GDP-D-mannóz-3,5-epimeráz, (6) L-galaktóz foszforiláz/L-galaktóz guaniltraszferáz, (7) L-galaktóz-1-P foszfátáz, (8) L-galaktóz dehidrogenáz, (9) L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz

3.1.3.1.1.2 A glutation

A GSH (redukált glutation) egy tripeptid és létfontosságú metabolit. A ROS által kiváltott oxidatív stresszel szembeni védelem egyik legfontosabb komponense. A növényi szövetekben túlnyomó részt redukált állapotban van jelen (GSH), és minden sejtalkotóban, illetve az apoplasztban is megtalálható. Több fiziológiai folyamatban is szerepet játszik (pl.: szulfát transzport, szignál továbbítás, metabolitok konjugálása, stresszválasz gének indukciója). A fentiekén kívül részt vesz a sejtek differenciálódásában, a sejthalál és az öregedés folyamatában, illetve a patogénitász rezisztencia kialakításában is ⁷.



4. ábra: A glutation (GSH) és a glutation-diszulfid (GSSG) szerkezete

A glutation szintézise két ATP-igényes lépésből áll. Az első – egyben sebesség-meghatározó – lépés során Cys és Glu kapcsolódásával γ -glutamilcisztein keletkezik. A második lépésben a glutation szintáz segítségével egy Gly kapcsolódik a γ -glutamilciszteinhez, ezzel GSH-t létrehozva ¹⁸.

A GSH szubsztrátként szolgál több, a sejtben lejátszódó reakció számára, amely során oxidálódik, és GSSG-t képez (4. ábra). A két molekula közti egyensúlynak központi szerepe van a sejt ideális redox állapotának fenntartásában, így az esetleges ROS-t ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$) elimináló és képződést gátló reakciókban is (pl.: aszkorbát-glutation ciklus) ^{7,18,21}.

A fent említett aszkorbát-glutation ciklus több kulcsfontosságú enzimatis és nem enzimatis antioxidáns összehangolt működésével jön létre (lásd 3.1.3.1.3 pont), nagymértékben felelős a sejt fiziológiás redox állapotának fenntartásáért.

3.1.3.1.1.3 Egyéb nem enzimatisz antiozidánsok

Az előző fejezetekben bemutatott két kulcsfontosságú nem enzimatisz antiozidáns, az aszkorbinsav, illetve a glutationon kívül számos vegyület rendelkezik gyökfogó tulajdonsággal, amelyek szintén nagyban hozzájárulnak a sejtek megfelelő redox státuszának fenntartásához, illetve az esetleges oxidatív stressz kivédéséhez.

Az antiozidáns rendszer nem enzimatisz komponensei közül fontos megemlíteni a prolint, amely képes az igen káros hidroxil gyök megkötésére. Az α -tokoferolok zsírban oldódó antiozidánsok, és többek közt a kloroplasztisz tilakoid membránjában helyezkednek el. A nagy ROS és LPO (lipid peroxidok) kötő kapacitáson felül membránstabilizáló funkcióval is rendelkeznek. A karotinoidok és a flavonoidok szintén hozzájárulnak a ROS és a LPO vegyületek viaszorításához stressz során.⁷

Bár ezen vegyületek jelentősége megkérdőjelezhetetlen, vizsgálatainkra gyakorolt hatásuk nem összemérhető az aszkorbinsav, illetve az aszkorbát-glutacion ciklus elemeinek fontosságával.

3.1.3.1.2 Enzimatisz antiozidánsok

Az enzimatisz antiozidánsok önmagukban, illetve nem enzimatisz antiozidánsokkal együttműködve képesek a reaktív oxigénvegyületek eliminálására.

Enzimatisz antiozidáns	Enzim kód	Katalizált reakció
Szuperoxid diszmütáz (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Kataláz (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Aszkorbát peroxidáz (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Glutacion peroxidáz (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Monodehidroaszkorbát reduktáz (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutacion reduktáz (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

2. táblázat: A fontosabb enzimatisz antiozidánsok és az általuk katalizált reakciók

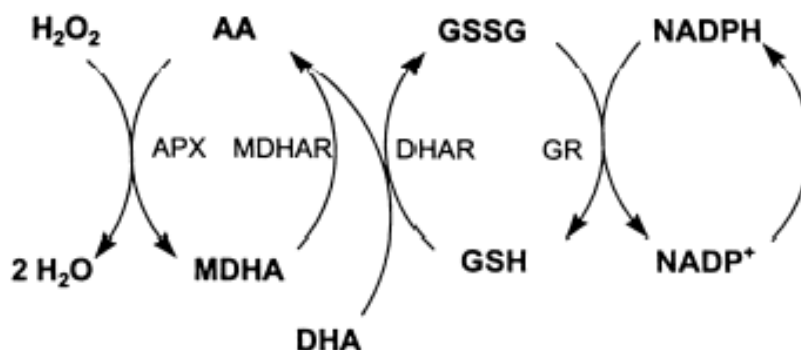
A SOD (szuperoxid-diszmütáz) alkotja az első védelmi vonalat a ROS-sal szemben, ezzel központi szerepet betöltve az alapvető stressz toleranciában. Szerkezetét tekintve a metalloenzimek közé tartozik. A fém kofaktorok alapján három csoportba osztható: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD. A SOD a sejt minden organelumában megtalálható, és reakciója során két szuperoxidot eliminál egy O_2 és két H_2O_2 keletkezése mellett. Működése viaszorítja a Haber-Weiss reakciót, amely a súlyosan toxikus hidroxil gyök keletkezését okozza^{7,22}.

A katalázok nélkülözhetetlenek a reaktív oxigénvegyületek eliminációs folyamataiban. Katalízise során hidrogén-peroxidot alakít át vízzé és oxigénné. A kataláz rendelkezik az egyik legnagyobb váltásszámmal az enzimek közül, amellyel közel 6 millió H_2O_2 molekula bontását végzi el percenként egyetlen CAT molekula ⁷.

A GPX (glutation-peroxidáz) szintén a H_2O_2 eliminálásában vesz részt, amelyhez GSH-t használ fel mint elektrondonort, így két GSH oxidációja révén GSSG (két glutation, diszulfid kötéssel összekapcsolódva) jön létre, így redukálva a hidrogén-peroxidot vízzé. A reakció révén a GPX is kiemelt szerepet játszik a ROS eliminációjában ^{7,23}.

3.1.3.1.3 Az aszkorbát-glutation (FHA) ciklus

Az aszkorbát-glutation (Foyer-Halliwell-Asada) ciklus kulcsszerepet tölt be a fiziológiás redox státusz fenntartásában, illetve mind biotikus, mind abiotikus stressz során létrejövő reaktív oxigénvegyületek eliminálásában. A folyamatban két nem enzimátikus (aszkorbát és glutation) és négy enzimátikus (APX, MDHAR, DHAR, GR) antioxidáns kap szerepet, illetve szorosan kapcsolt a $\text{NADPH} \leftrightarrow \text{NADP}^+$ átalakuláshoz (5. ábra).



5. ábra: Az aszkorbát-glutation (Foyer-Halliwell-Asada) ciklus

A ciklus során az aszkorbát-peroxidáz aszkorbinsav terhére H_2O_2 -t redukál vízzé. A folyamat eredményeképpen a víz mellett MDHA (monodehidroaszkorbát) keletkezik, amely két módon képes redukálódni. Az első lehetőség során a MDHAR (monodehidroaszkorbát reduktáz) enzim egy lépésben aszkorbinsavvá redukálja a MDHA-t, míg a második esetben a MDHA nem enzimátikus diszproporcionálódása következik be, amely során DHA (dehidroaszkorbát) keletkezik, amelyet a DHAR (dehidroaszkorbát-reduktáz) szintén aszkorbinsavvá redukál. Mind a MDHAR, mind a DHAR glutation terhére végzi a redukciót.

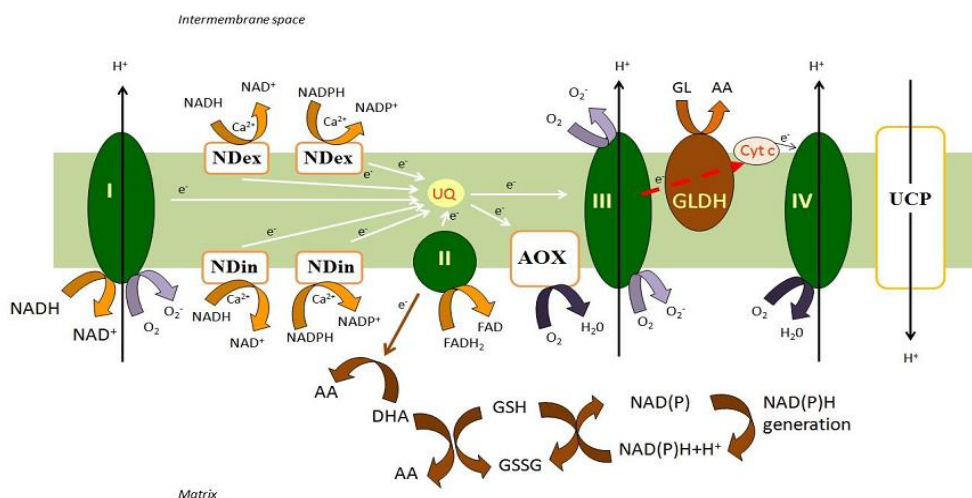
Az aszkorbát regenerálása során oxidált állapotba kerülő glutationt (GSSG) a glutation-reduktáz képes ismét redukált állapotba (GSH) hozni, amely átalakítás NADPH terhére történik.

A fentiek alapján elmondható, hogy a két legfontosabb nem enzimatisz antioxiidász (aszkorbát, glutation) szoros kapcsolatban áll egymással, mivel az aszkorbát regenerációjához GSH szükséges ^{7,18,24}.

A ciklus kulcsfontossága a ROS képződés szabályozásában, illetve a sejt védelmi rendszerében kutatásaink célkeresztjébe helyezte a részt vevő enzimek aktivitásmérését, illetve az aszkorbát mennyiségének és redox állapotának monitorozását.

3.1.3.2 A mitokondriális elektrontranszportlánc szerepe a ROS eliminációban

A mitokondrium igen érzékeny a reaktív oxigénvegyületek akkumulációjára, ezáltal az oxidatív stresszre, ezért a mitokondriális elektrontranszportlánc (ETC) (6. ábra) saját védelmi mechanizmusokkal rendelkezik a ROS keletkezésének megelőzésére, illetve a már létrejött káros vegyületek eliminálására ²⁵.



6. ábra: A mitokondriális belső membrán komponensei

Az ETC túlredukálódott állapotát a mitokondrium igyekszik megelőzni, illetve csökkenteni. Az úgynevezett "energiapazarló" (*energy dissipating*) folyamatok célja a fent említett túlredukáltság csökkentése, ezzel fontos szabályozási szerepet betöltve az oxidatív stressz, illetve az esetleges oxidatív kitörés (*oxydative burst*) során ²⁵⁻²⁸.

3.1.3.2.1 Az ETC energiapazarló (*energy dissipating*) komponensei

3.1.3.2.1.1 A rotenon rezisztens alternatív NAD(P)H dehidrogenázok (ND-k)

Az ND-k működésük során NADPH oxidációját végzik, ezzel elektronokat továbbítva az UQ-ra, de ebben az esetben ez nem jár protonpumpa aktivitással. A fentiek értelmében csökkentik az energiahozamot, de általuk megkerülhető az I. komplex ²⁹. Szerepük harpin fehérjék által kiváltott biotikus stresszben jelenleg nem teljesen tisztázott.

3.1.3.2.1.2 Az UCP (szétkapcsoló fehérjék, *uncoupling proteins*)

Az UCP proteinek hiperszenzitív reakcióban való szerepéről jelenleg nincsenek egyértelmű irodalmi adatok. Energiapazarló működésük során protont pumpálnak a mitokondriális intermembrán-tér felől a mátrixba. Ezen tulajdonsága arra enged következtetni, hogy az UCP-k szabályozó szerepet tölthetnek be az oxidatív foszforilezésben, mégpedig a membránnal határolt terek potenciálkülönbségének optimális beállításával, ezen felül szerepet játszhatnak a ROS képződésének csökkentésében ²⁵.

3.1.3.2.1.3 Az alternatív oxidáz (AOX)

Funkcióját tekintve terminális oxidáz, amelynek feladata az ETC túltelítődésének megakadályozása. Működése során elektronokat szállít az ubikinonról O₂-re, eközben nem pumpál protonokat az intermembrán térbe. Az "energiapazarlás" révén megkerüli a mitokondrium III. és IV. komplexét, így látva el védelmi/biztonsági szerepét ³⁰.

Viselkedését többféle biotikus és abiotikus stresszhelyzetben is vizsgálták már, és az eredmények szerint egyértelműen fontos szerepe van a stresszválaszban. A vizsgálatok azt mutatják, hogy az AOX aktivitásának gátlásakor a sejtekben levő ROS mennyisége megnő. A normál citokróm elektrontranszport rendszert antimycin A-val gátolva az AOX expressziója jelentősen nő, ezzel egyidejűleg a ROS-t elimináló enzimeket (szuperoxid-diszmutáz, glutation peroxidáz) kódoló géneké csökken. A fentiek alapján az AOX egyértelmű markere lehet a mitokondriális oxidatív stressznek, illetve hasonlóan fontos szerepet tölthet be a stresszválasz kialakítása során ^{26,31–33}.

Az alternatív oxidáz a szabályozásban betöltött szerepe és védelmi funkciója miatt kiemelt szerepet kapott vizsgálataink során.

3.1.4 A reaktív oxigénvegyületek mint szignálok

A reaktív oxigénvegyületek káros hatásukon túl szignálként is funkcionálnak a sejtekben. A növényekben mind biotikus, mind abiotikus stressz hatására a ROS termelés megugrása figyelhető meg, ez az úgynevezett oxidatív kitörés (*oxidative burst*)¹². A megemelkedett ROS szintre a sejtnak mihamarabb reagálnia kell. Ezek a változatos természetű reakciók irányulhatnak a homeosztázis visszaállításában segédkező enzimek (antioxidáns termelő és regeneráló, javító és védő hatású enzimek) expresszió-, illetve aktivitásnövelésére, megfelelően magas ROS szint esetén a programozott sejthalálhoz (Programmed Cell Death, PCD) vezető kaszkád beindítására, illetve a fiziológiástól eltérő, magas ROS szint fenntartására. A reaktív oxigénvegyületek emelkedett szinten tartása segít a növénynek a patogén elleni küzdelemben, míg a programozott sejthalál beindítása igen fontos védelmi eszköz erőteljes stresszhatás esetén. Azzal, hogy a stressznek leginkább kitett sejtek elpusztítják magukat, a növény egészére nézve csökkenthetők az elszenvedett károk^{9,10,34,35}.

3.2 A növényi immunválasz

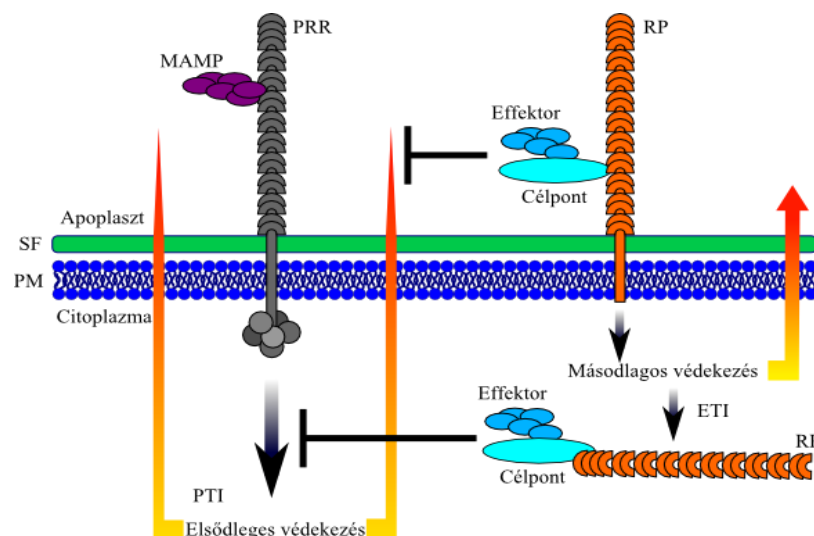
3.2.1 Általános bemutatás

A növények – csakúgy, mint minden más többsejtű organizmus a Földön – különféle fertőzéseknek vannak kitéve, amelyekkel szemben elengedhetetlen a védekezés.

A növények immunrendszere két védelmi vonallal rendelkezik, és mindkettőben fontos szerep jut az *oxidative burst*-nek, amely a növény-patogén interakció során az egyik legkorábbi sejtválasz^{2,36,37}.

3.2.2 Mintázat és effektor által kiváltott immunitás

Az első védelmi vonal a patogének MAMP/PAMP-jainak (*microbe/pathogen-associated molecular patterns*, mikrobához/patogénhez kapcsolt molekuláris mintázat) felismerése révén kiváltott immunreakció. A MAMP megfelelő receptorok (*pattern recognition receptor*, PRR) általi érzékelése után igen gyorsan beindul a ROS termelés, és kis amplitúdóval, viszonylag rövid ideig tart. Szerepe kettős: az ekkor termelt ROS egyrészt szignálként funkcionál a további immunreakciók beindításához, másrészt károsítja a patogént. Ilyenkor a ROS termelésért főleg a plazmamembránban elhelyezkedő NADPH-oxidázok felelősek, amelyek a sejtben lévő NADPH oxidációjával és az apoplaztban található molekuláris oxigén redukációjával szuperoxid gyököket állítanak elő, amelyek gyorsan hidrogén-peroxiddá alakulnak spontán módon vagy szuperoxid-dismutáz enzim katalizálta reakcióban. Ezt az immunreakciót „*pattern-triggered immunity* (PTI)”-nek nevezzük (7. ábra)³⁸.



7. ábra: A növényi immunrendszer két védelmi vonala. A patogén által termelt effektorok elnyomhatják az elsődleges védelmi vonalat jelentő PTI-t (*pattern-triggered immunity*), így a növényekben megjelentek a másodlagos védelmi vonalat jelentő R fehérjék. Ezek felismerik az effektort, és beindítják a megfelelő válaszreakciókat, amelyeket együttesen ETI-nek (*effector-triggered immunity*) nevezünk³⁹.

Az evolúció során bizonyos patogének alkalmazkodtak ehhez a védekezési mechanizmushoz, és olyan effektorok termelésébe kezdtek, amelyek a sejtbe jutva elnyomják a PTI-t.

Ennek ellensúlyozására második védelmi vonalként megjelentek az R fehérjék (*plant resistance proteins*, R proteins) a növényi sejtekben, amelyek feladata a patogének által termelt effektorok felismerése, és ezáltal a megfelelő válaszreakciók beindítása, amelyeket együttesen „*effector-triggered immunity* (ETI)”-nek nevezünk (7. ábra). Ilyen esetben kétfázisú *oxidative burst* figyelhető meg. Az első fázis gyors, kis amplitúdójú (feltehetőleg szintén MAMP felismerése váltja ki), míg a második szakasz hosszú időtartamú és magas intenzitású. Az ETI során a NADPH-oxidázok mellett az egyéb intracelluláris ROS források is szerephez jutnak, amelyek közül feltehetően a mitokondrium a legfontosabb. Az effektorok által kiváltott reakciósorozat leggyakrabban hiperszenzitív sejthalálhoz vezet, amelynek pontos módja a felismert effektortól függően más és más lehet ^{6,38–41}.

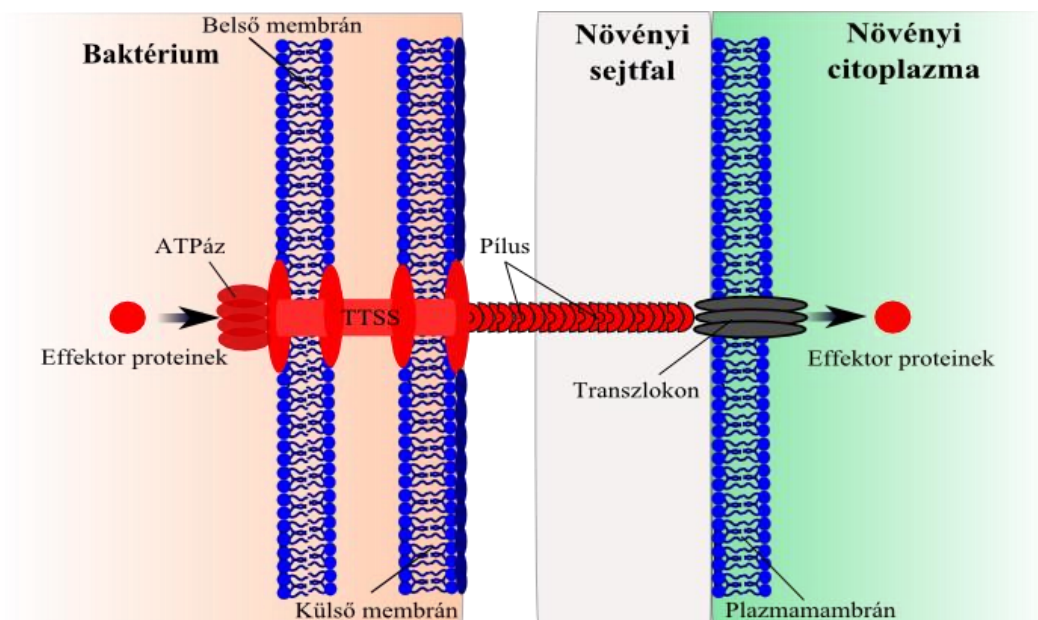
3.3 Harpin fehérjék

A harpinek olyan savas, hőstabil, glicinben és leucinban gazdag, vízzoldható fehérjék, amelyeket III-as típusú fehérje szekréciós rendszerrel rendelkező baktériumok, mint pl.: *Pseudomonas syringae* és *Erwinia amylovora* termelnek ^{42,43}.

3.3.1 A III-as típusú fehérjeszekréciós rendszer

A bakteriális virulencia faktorok genetikai elemzése kimutatta, hogy a patogén baktériumokat az különbözteti meg nem patogén társaiktól, hogy úgynevezett patogenitási géneket tartalmaznak. Ezek a gének gyakran úgynevezett „patogenitási szigetekbe” szerveződve találhatóak a genomban, amely valószínűleg annak köszönhető, hogy az evolúció során horizontális géntranszferrel kerültek az adott baktériumba. Ezt a feltevést alátámasztja, hogy egymással távoli rokonságban álló patogének is hasonló virulencia géneket tartalmaznak.

A leginkább konzervált, megközelítőleg húsz, úgynevezett *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) gén kódolja a III-as típusú fehérje szekréciós rendszert. Ez a rendszer fehérjecsatornát alkot a célsejt sejtfalában és membránjában (8. ábra), így téve lehetővé a Gram-negatív patogéneknek, hogy fehérjéiket eukarióta sejtek citoszoljába juttassák. Jellemző a gének konzerváltságára, hogy *Yersinia*-ban és *Erwinia*-ban teljesen megegyezik ez a rendszer, de az eukarióta sejtbe szekretált fehérjék eltérők ^{44,45}.



8. ábra: A harmas típusú szekréciós rendszer (TTSS). Egyes patogén baktériumok a TTSS segítségével (píluson keresztül) képesek az effektor molekulák célsejtbe juttatására. A bejuttatott effektor molekulák infekciót idéznek elő, amelyek immunválaszt indukálnak a növényben ⁴⁵.

3.3.2 A harpinek hatásai

A harpinek hiperszenzitív sejthalált váltanak ki a nem-gazda növényekben, szerepük a gazda növényekben egyelőre tisztázatlan, de feltételezhetően érzékennyé teszik azokat az avirulencia gének termékeire ⁴².

A harpineket a növényi sejtek receptorai PAMP-ként ismerik fel, miután a fehérje a plazmamembránhoz kötődött. A sejthalálhoz vezető reakciókat ezt követően egy receptor-mediált MAPK (*Mitogen-activated proteinkinase*) függő szignálrendszer indítja. Ennek során megnövekedett ROS termelés, erős pH változás, megnövekedett kalcium beáramlás a citoszolba, és az immun-válasz gének megnövekedett expressziója figyelhető meg ^{42,43,46}.

A válaszreakciókban fontos szerep jut a mitokondriumnak. Megnövekedik a mitokondriális ROS termelés, csökken a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$), ebből kifolyólag az ATP termelés. Ezen felül megfigyelhető a citokróm c gyors citoszolba juttatása a mitokondriumból, amelyet a programozott sejthalál előszobájaként tartanak számon ^{15,47}.

3.3.3 Harpinek a növényvédelemben

Kisebb koncentrációban (nM) a harpinek hatására nem következik be szükségszerűen a sejthalál, de ugyanúgy megnő az immunválasz-gének expressziója, amelynek hatására a növény ellenállóbbá válik a patogénnel szemben. Ezen felül a haripnekekkel kezelt növényekben számos előnyös hatás figyelhető meg, mint például a növény nagyobb terméshozama és intenzívebb növekedése.

A fent említett hatások miatt a harpinek ígéretes biopeszticidek lehetnek. A piacon már megjelentek ilyen jellegű termékek, például az Eden Bioscience Messenger® STS nevű növényvédő szere, amely 3% harpin fehérjét tartalmaz aktív összetevőként ^{42,48,49}.

3.3.4 Kezeléseinkhez használt harpinek és jellemzőik

A HrpZ_{pto} és HrpW_{pto} (3. táblázat) a *Pseudomonas syringae* pv. tomato által termelt harpinek, amelyek hiperszenzitív reakciót válthatnak ki nem-gazda növényi sejtekben. Szerepük a sikeres baktérium fertőzés során jelenleg ismeretlen.

Fehérje neve	Accession number	Méret (aminosav)	Becsült tömeg
HrpW _{pto}	AAF71503.1	424	49,9 kDa
HrpZ _{pto}	AAB00127	370	36,6 kDa

3. táblázat: HrpW_{pto} és hrpZ_{pto} adatai

A HrpZ_{pto}-t kódoló gén a *hrp* klaszteren belül található egy policisztronos operonban. Képes lipidek megkötésére és ionáteresztő pórusok létrehozására mesterséges lipid bilayer-ekben ⁵⁰.

A HrpW_{pto} a *hrp* klaszter szomszédságában található, konzervált effektor lókuszban kerül kódolásra. A fehérje két doménből épül fel, N-terminálisán egy harpin domén, C-terminálisán pedig egy pektát-liáz domén található. A pektát-liáz domén, amely homológ a PL3 pektát-liázzal, képes kalcium-pektáthoz kötődni, de enzimatisz aktivitást nem mutat, a hiperszenzitív reakció kiváltásában csak a harpin domén játszik szerepet ⁵⁰.

4 Célkitűzés

Növény-patogén interakció esetén létrejövő biotikus stressz során az egyik legkorábbi sejtválasz az úgynevezett oxidatív kitörés, amely a reaktív oxigénvegyületek szintjének hirtelen emelkedésével jár. A folyamatért főként a plazmamembránban lokalizálódó NADPH oxidázok működése felelős (lásd 3.2)¹². A kitörés során keletkező reaktív oxigénvegyületek védelmi szerepe kettős. Akkumulációjuk nagy reaktivitásuknak köszönhetően közvetlenül károsítja a patogént, ezen felül szignálmolekulaként is funkcionálnak, ezáltal részt vehetnek további védekező mechanizmusok beindításában, amelyek további ROS képződéssel járhatnak. A védelmi szerep ellátásához elegendő, de a gazdasejt számára nem fatális mennyiségű ROS szint fenntartásához az antioxidáns rendszernek (lásd 3.1.3.1) reagálnia kell^{1,2,7-9}.

A fentiek alapján célul tűztük ki az egyik legfontosabb nem enzimatis antioxiáns, az aszkorbinsav metabolizmusának nyomon követését biotikus stressz során.

Az alábbi részfolyamatokat kívántuk górcső alá venni:

- az általános mitokondriális stresszmarker, az AOX génexpressziójának vizsgálata
- az aszkorbát szintézisében kulcsszerepet játszó GLDH, VTC2 és VTC5 gének expressziójának vizsgálata
- az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek aktivitásvizsgálata
- az aszkorbátszintézis zárólépését katalizáló GLDH enzimaktivitásának vizsgálata
- az aszkorbát mennyiségének és redox státuszának monitorozása

5 Anyagok és módszerek

5.1 Sejtfenntartás

A szuszpenziós sejt kultúrákat steril, csavaros kupakkal ellátott Erlenmeyer-lombikokban tartottuk fenn.

Araidopsis thaliana szuszpenziós sejt kultúra:

Inkubálás paraméterei:	22°C, 120 rpm-es rázatás
Tápoldat összetétele:	0,44% MS+Gamborg (Sigma Aldrich)
	3% szacharóz
	0,24µg/ml 2,4-D (2,4-diklorofenoxi-ecetsav)
	0,014µg/ml kinetin
	4mM PBS (K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)
	pH=5,8

A sejtvonal fenntartásának céljából heti rendszerességgel tömény (7 napos) sejtsuszpenzióból tízszeres hígítással oltottunk át új tápoldatba. Ezzel a módszerrel a vizsgálatokhoz szükséges sejttömeget is folyamatosan biztosítani tudtuk.

Fehérjetermelő *Escherichia coli* konstrukciók:

Inkubálás paraméterei:	fenntartás/expresszió: 37/32°C, 120 rpm-es rázatás
Tápoldat (LB-Amp) összetétele:	1% Bacto Tryptone
	0,5% Bacto Yeast-Extract
	0,5% NaCl
	50µg/ml Ampicillin

A fehérjetermelő konstrukciók folyamatos fenntartása nem volt szükséges, ezért ezeket 15% glicerol tartalmú LB tápoldatban fagyasztva tároltuk (-80°C).

A szükséges fehérjék termeltetéséhez a fagyasztott baktériumkultúrából szelekciós (Amp) táptalajra oltottunk ki, majd a 37°C-os éjszakán át tartó inkubáció után kinőtt telepekből 20ml-es folyékony szelekciós (Amp) tápoldatba oltottunk át. A sejtsuszpenziót szintén egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37°C-on, és az így kapott sűrű tenyészetből oltottunk át a termeléshez szükséges mennyiségű sejttömeg eléréséhez. A tápoldatok sterilitását autokláv használatával biztosítottuk. Az összes sejtekkel végzett munkát steril lamináris fülkében végeztük, szintén steril eszközök használatával.

5.2 A felhasznált fehérjék előállítása és ellenőrzése

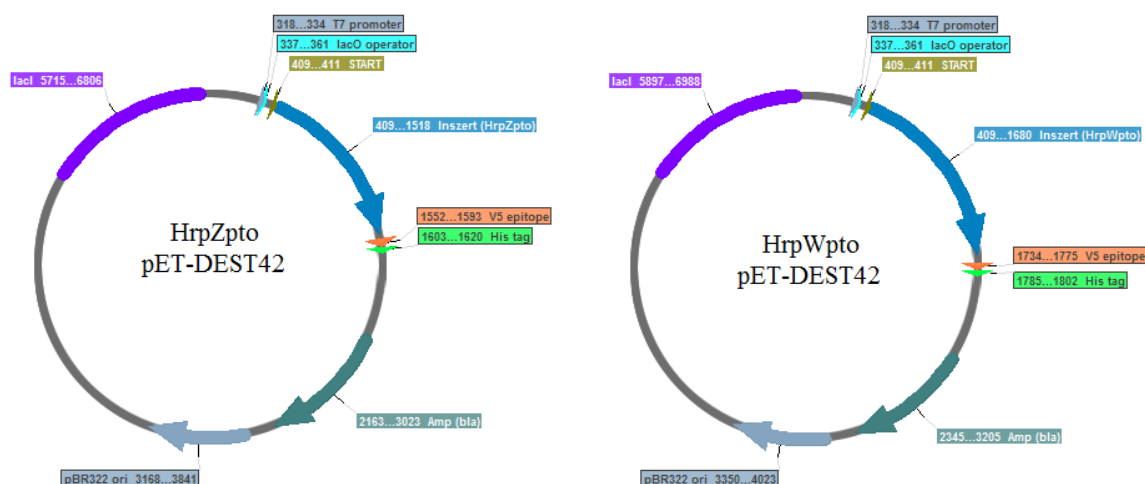
A fehérjéket rekombináns úton állítottuk elő. A baktériumba vitt konstrukciók rendelkezésünkre álltak⁵⁰, így a mi feladatunk csupán az expresszáltatás és a kívánt protein kinyerése/tisztítása volt.

5.2.1 Az alkalmazott konstrukciók bemutatása

Inszer szarmazasa	Expressziós sejt	Plazmid	Fehérje
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3))	pET-DEST42	HrpZ _{pto} (~36,6kDa)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pET-DEST42	HrpW _{pto} (~49,9kDa)

4. táblázat: A HrpZ_{pto} és HrpW_{pto} fehérjék termeltetésé során alkalmazott vektorok és expressziós törzsek

A két konstrukció igen hasonló, mivel mindkét esetben a pET-DEST42 vektort (amely tartalmazza a specifikus inszeret) vittek be *Escherichia coli* BL21 (DE3) expressziós sejtvonalba.



9. ábra: A HrpZ_{pto} és HrpW_{pto} fehérjék termeltetéséhez alkalmazott vektor - A plazmid tartalmazza a fehérjéket kódoló inszeret, illetve az indukciót lehetővé tevő operátor régiót. A tisztíthatóságot a His-tag, a szelekciót pedig Ampicillin rezisztencia biztosította.

A pET-DEST42 vektor pBR322 replikációs origóval rendelkezik. A plazmidban található T7 promóter lehetővé teszi a nagymértékű expressziót, míg a *lac operon* biztosítja az IPTG-vel történő indukálhatóságot, amely a *lac operon* természetes aktiválásához szükséges laktóz analógja.

A plazmid az Ampicillin rezisztencia génjét (*bla*) is tartalmazza, így könnyen szelektálhatók a transzformált sejtek a plazmidot nem tartalmazó baktériumsejtek közül. Az inszert 3' végéhez kapcsolódó, de a plazmid részét képező V5 epitóp lehetővé teszi a fehérje immunreakción alapuló mennyiségi meghatározását, a His-tag hat darab hisztidinje pedig biztosítja a fehérje biospecifikus (affinkromatográfiás) elválaszthatóságát, mivel ezen részlet erős kölcsönhatásba lép nikkel ionokkal ⁵⁰.

5.2.2 A fehérje előállításának menete

5.2.2.1 A fehérjék termeltetése

A sejtfenntartás során ismertetett módon előállítottuk az átoltásra alkalmas tömény sejtsuszpenziót. A sűrű sejttenyészetből 5-10ml-t 500ml LB-Amp tápoldatba oltottunk OD₆₀₀=0,05 körüli érték eléréséhez, majd 37°C-on inkubáltuk rázatást (120 rpm) alkalmazva. A baktériumok mennyiségét abszorbanciaméréssel követtük nyomon, és az OD₆₀₀=0,5-0,6 érték elérésekor IPTG-vel (1mM végkoncentráció) indukáltuk a fehérjék termelődését.

A módszer beállítása során azt tapasztaltuk, hogy a 32°C-on történő, hozzávetőleg 3,5-4 órás indukció eredményezi a legnagyobb mennyiségű terméket, így a léptéknövelt termeltetés során ezt alkalmaztuk.

Szintén az előzetes kísérletek során vált bizonyossá, hogy az általunk termeltetett fehérje intracelluláris, ezért célunk a sejttömeg szuszpenzióból való kinyerése volt, amelyből sejtfeltárás után kinyerhetővé vált a fehérje. Ezt centrifugálással (5300 g, 10 perc) értük el. A csapadékká összeállt sejttömeget -20°C-on tároltuk a feldolgozás megkezdéséig.

5.2.2.2 A fehérjék kinyerése és tisztítása

A kívánt fehérje kinyerését és affinkromatográfiás tisztítását *Invitrogene ProBond Purification System* segítségével végeztük.

A módszer alapja a fehérjén található hat egymást követő hisztidin (His-tag) erős kölcsönhatása nikkel ionokkal. Az agaróz gél alapú, Ni²⁺ ionokat tartalmazó oszlop képes az általunk termelt His-tag-gel rendelkező fehérjék specifikus megkötésére. Az oszlophoz kötődő fehérjéket több lépésben mostuk, így az elúciót követően tiszta és specifikus fehérjeoldatot kaptunk.

5.2.2.2.1 Alkalmazott oldatok

Guanidinium Lysis Buffer (6M Guanidine-HCl; 500mM NaCl; 20mM Na₃PO₄, pH=7,8)

ProBond Nickel-Chelating Resin (50% gél; 20%-os etanolban)

Denaturing Binding Buffer (8M Urea; 500mM NaCl; 20mM, pH=7,8)

Denaturing Wash Buffer (8M Urea; 500mM NaCl; 20mM Na₃PO₄, pH=6,0)

Native Wash Buffer (20mM imidazol; 500mM NaCl; 50mM NaH₂PO₄, pH=8,0)

Native Elution Buffer (250mM imidazol; 500mM NaCl; 50mM NaH₂PO₄, pH=8,0)

5.2.2.2.2 Sejtfeltárás

A fagyasztás után felolvadt sejteket 8 ml 37°C-os Guanidinium Lysis pufferben vettük fel, majd 5-10 percig óvatosan kevertük. A sejtszuszpenziót 6x10 másodpercig maximális amplitúdón, jégen tartva szonikáltuk. A kapott lizátumot 5300 g-n 10 percig centrifugáltuk, majd az azonos típusú fehérjéket tartalmazó felülúszókat egyesítve tiszta Falcon-csőbe pipettáztuk.

5.2.2.2.3 Az oszlop előkészítése

A *ProBond Nickel-Chelating Resin* gél könnyen leülepszik, ezért használat előtt újra kell szuszpendálni.

A könnyebb áttekinthetőség érdekében az oszlop előkészítésének lépéseit pontokba szedve ismertetjük:

1. A kit által tartalmazott műanyag tisztítóoszlopba bemértünk 2ml felsuszpendált *ProBond Nickel-Chelating Resin*-t, majd 1 perces 800 g-s centrifugálással üleptítettük.
2. A leülepedett gél rétegről eltávolítottuk a felülúszót, majd 6ml steril desztillált víz hozzáadása után ismét felsuszpendáltuk.
3. A szuszpenziót ismételt centrifugálással (800 g, 1 perc) üleptítettük, majd eltávolítottuk a felülúszót.
4. A fenti mosási lépés után a gél 6ml Denaturing Binding Bufferben való felsuszpendálásával kondicionáltuk az oszlopot, majd ismételt centrifugálás (800 g, 1 perc) után eltávolítottuk a felülúszót.
5. A 4. lépést megismételtük, így az oszlop alkalmassá vált az általunk termeltetett fehérjék specifikus megkötésére.

5.2.2.2.4 A fehérje tisztítása

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a fehérjetisztítás lépéseit pontokba szedve ismertetjük:

1. Az előkészített oszlophoz adtuk a sejtfeltárási termékét, majd a fehérjék megkötődésének érdekében 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A gél leülepedésének elkerülése végett rázattuk az oszlopot, amivel biztosítottuk a maximális érintkező felületet is.
2. A fehérjék megkötődését követően centrifugáltuk az oszlopot 800 g-n 1 percen keresztül, majd a felülúszót eltávolítottuk.
3. Az első mosási lépés során 4ml Denaturing Binding Bufferben felfuszpendáltuk a gél, majd centrifugálás (800 g, 1 perc) után eltávolítottuk a felülúszót. Ezt a lépést még egyszer megismételtük.
4. A második mosási lépés során 4ml Denaturing Wash Bufferben felfuszpendáltuk a gél, majd centrifugálás (800 g, 1 perc) után eltávolítottuk a felülúszót. Ezt a lépést még egyszer megismételtük.
5. A harmadik mosási lépés során 8ml Native Wash Bufferben felfuszpendáltuk a gél, majd centrifugálás (800 g, 1 perc) után eltávolítottuk a felülúszót. Ezt a lépést még háromszor megismételtük.
6. Az elúciót 10ml Native Elution Bufferrel végeztük. Az eluátumot steril Eppendorf-csővekbe gyűjtöttük 1ml-es egységenként.

A tisztítások során kapott első 3-4ml eluátum tartalmazta a fehérje túlnyomó részét, az utolsó 2-3ml eluátum fehérjetartalma pedig elhanyagolható volt a teljes mennyiséghez képest.

5.2.2.2.5 A fehérjeoldatok koncentrálnálása és puffercsere

Az eluátum koncentrálnálása membránszűréssel történt. A fehérje nem képes átmenni a membránon, az oldószer, illetve kisebb molekulák viszont igen.

A koncentrálnálást *Merck Millipore Amicon Ultra-2 ml* kit használatával végeztük.

A szűrőoszlopot megtöltöttük 2ml eluátummal, majd 45 percig 7500 g-n centrifugáltuk. Ezután a hozzávetőleg 300-400µl-es visszamaradt tömény eluátumhoz további centrifugálási lépések közt adagoltuk az eredeti eluátum többi részét. A végső lépésben a 300-400µl-nyi tömény fehérjeoldatra 1,5ml 5mM-os MES (pH=5,5) puffert adagoltunk, és ismét centrifugáltuk a szűrőt. A lépés megismétlése után keletkező 400-500µl, MES pufferben felvett fehérje alkalmas a növényi sejtek tervezett kezelésére.

5.2.3 Az előállított fehérjék ellenőrzése

5.2.3.1 A fehérjék mennyiségi meghatározása

A kvantitatív elemzést spektrofotometriás módszerrel, a *Pierce* által gyártott *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* segítségével végeztük. A koncentrált fehérjemintákat 5mM MES pufferrel tízszeresére hígítottuk (50 μ l végtérfogat), és 250 μ l Bradford reagenst (Brilliant Blue G alkoholos, foszforsavas oldata) adtunk hozzájuk.

A viszonyítási alapul szolgáló standard sor elkészítéséhez felhasznált 2mg/ml-es BSA (*bovine serum albumin*) törzsoldatot a kit tartalmazta. Az oldat hígításához 5mM MES (pH=5,5) puffert használtunk, és szintén Bradford reagenst (250 μ l) adtunk hozzá.

A standard sor koncentrációja:

31,25 μ g/ml	62,5 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
------------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	-----------------

A mérést *Thermo Scientific Multiskan GO* plate reader segítségével 595 nm-en végeztük, vak oldatként 5mM MES (pH=5,5) puffert alkalmaztunk.

A töményített fehérjepreparátumból mért átlagos koncentráció HrpZ_{pto} esetén ~6mg/ml, míg HrpW_{pto} esetén ~3mg/ml volt.

5.2.3.2 A fehérjék minőségi elemzése

A fehérjék kvalitatív elemzését SDS-PAGE gélelektroforézissel végeztük. Az alkalmazott 12%-os futtató gél elkészítéséhez szükséges oldatok és mennyiségük:

H ₂ O	5,1ml
1,5M Tris-HCl, pH:8,8	3,75ml
20% SDS	0,075ml
akrilamid/bisz-akrilamid (30%/0,8%)	6ml
10% ammónium perszulfát (APS)	0,075ml
N,N,N',N'-Tetrametiletán-1,2-diamin (TEMED)	0,01ml

Az alkalmazott 4% akrilamid tartalmú tömörítő gél elkészítéséhez szükséges oldatok és mennyiségük:

H ₂ O	1,5325ml
0,5M Tris-HCl, pH: 6,8	0,625ml
20% SDS	0,0125ml
akrilamid/bisz-akrilamid (30%/0,8%)	0,335ml
10% ammónium perszulfát	0,0125ml
N,N,N',N'-Tetrametiletán-1,2-diamine	0,0025ml

Az alkalmazott futtató puffer összetétele (steril desztillált vízben oldva):

25mM Tris-HCl

200mM glicin

1% SDS

pH: 8,3

A minta előkészítéséhez használt 2x Buffer összetétele:

4% SDS

20% glicerol

10% 2-merkaptoetanol

0.004% brómfenolkék

0.125M Tris-HCl,

pH: 6,8

A mintákat 1:1 arányban kevertük össze a mintaelőkészítő (*sampling*) pufferrel, majd 92°C-on 3 percig melegítettük az előkészítés során. A minták felvitele előtt 10 percig konstans 40mA áramerősséggel előfuttattuk a gélt, majd a mérés során konstans (60mA) áramerősséget használtunk.

A kiértékeléshez a gélt 12 órán keresztül 50% metanolt és 10% esetsavat tartalmazó oldatban áztattuk, majd 4 órán keresztül 0,1%-os Coomassie oldatban festettük. A festék feleslegét ismét a fent említett (50% metanol, 10% esetsav) oldatban való áztatással távolítottuk el. A gélt ezután 5%-os esetsav oldatban kondicionáltuk, majd ugyanebben az oldatban tároltuk a kiértékelésig. A futtatás eredménye minden esetben kielégítő volt, a fehérjék a várt sebességgel futottak a gélben.

5.3 Az *in vitro* stressz rendszer

A vizsgálatok során *Arabidopsis thaliana Col-0* vad típusú szuszpenziós sejt kultúrát *in vitro* kezeltünk rekombináns módon termeltetett HrpZ_{pto} és HrpW_{pto} fehérjékkel.

5.3.1 A növényi sejtek kezelése harpin fehérjékkel

A növényi sejtek fenntartásból származó hét napos *A. thaliana* kultúrából tízszeres hígítást készítettünk, amelyet további öt napig növesztettünk steril körülmények között. A kezelést szintén steril Erlenmeyer-lombikokban végeztük 100ml/lombik sejtsuszpenzió használatával.

A kezelés megkezdésekor hozzáadtuk az előre meghatározott végkoncentráció kialakításához megfelelő mennyiségű, ismert koncentrációjú fehérjeoldatot a sejtsuszpenzióhoz. Az eredetileg 5mM MES (pH=5,5) pufferben felvett fehérjék koncentrációja eltérő volt, így a kezelés előtt ezeket kiegyenlítettük szintén 5mM MES (pH=5,5) puffer használatával, így azonos térfogatú fehérjeoldat került minden lombikba. A kontroll kezeléshez 5mM MES (pH=5,5) puffert alkalmaztunk.

A kezelés során az eredeti körülmények közt (22°C, 120 rpm rázatás) inkubáltuk a sejteket. A kezelés minden egyes lépését (átoltás, fehérje hozzáadása, mintavétel) steril fülkében, steril eszközök használatával végeztük.

5.3.2 Mintavételezés, mintakezelés, mintaelőkészítés

A kezeléseket során előre meghatározott időközönként mintákat vettünk a válaszreakció nyomon követésének céljából. A mintavétel steril körülmények közt, steril Falcon-cső használatával történt. A lombikból a kezelés adott időpontjában vételezett 10ml sejtsuszpenziót szűrtük, ezután egy új, folyékony nitrogénben hűtött steril Falcon-csőbe helyeztük, majd az így nyert mintákat feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

A génexpressziós és az enzimaktivitás vizsgálatok folyékony nitrogénben feltárt sejttermeléből történtek, amelyet porcelán dörzsmozsárban történő dörzsöléssel, folyamatos folyékony nitrogénadagolás mellett hoztunk létre, majd a vizsgálatok megkezdéséig steril Eppendorf-csőben, -80°C-on tároltuk. A HPLC-s aszkorbinsav mérésekhez szükséges mintákat 5% ecetsavban, jégen történő Potter Elvehjem sejthomogenizátorral történő sejteltárással állítottuk elő, ezután szintén steril Eppendorf-csővekben, -80°C-on tároltuk a mérésekig.

5.4 Relatív génexpressziók vizsgálata

Az expressziómérés kivitelezéséhez szükséges az adott mintából történő RNS izolálás, majd az izolátumból történő cDNS szintézis (reverz transzkripció). A cDNS-ből specifikus primerpárokkal végzett RT-PCR vizsgálatok révén meghatározhatjuk a vizsgálandó fehérjéket kódoló gének (AOX, GLDH, VTC2, VTC5) expresszióját. Ehhez szükségünk volt egy igen stabil "housekeeping" génre (YLS8) specifikus primerpárral végzett párhuzamos mérésre is, amely RT-PCR során viszonyítási alapként szolgált.

5.4.1 RNS izolálása és ellenőrzése

Az izolálást DNáz és RNáz mentes, steril Eppendorf-csőben, steril körülmények közt, szintén DNáz és RNáz mentes eszközökkel végeztük fagyott, hozzávetőleg 0,5cm³ térfogatú folyékony nitrogénben feltárt mintákból, az alábbi (a jobb áttekinthetőség végett pontokba szedett) protokoll szerint:

1. A fagyott, por állagú sejtörmelékhez 0,5ml 65°C-os TES (2M Tris-HCL pH=8,0; 0,5M EDTA pH=8,0; 20% SDS 1:2:1 arányú keveréke) puffert adtunk, majd vortex segítségével feloldottuk a mintát.
2. A felvett mintához 0,5ml pH=8,0 fenol-kloroformot (Sigma 77617; pH=7,7-8,3) adtunk, majd ismét vortexen kevertük.
3. A mintát asztali centrifugán 10 percig 14000 rpm-en centrifugáltuk 4°C-on.
4. A kapott felülúszót új Eppendorf-csőbe pipettáztuk, és 0,5ml kloroformot adtunk hozzá, majd ismét centrifugáltuk a 3. pont paramétereit szerint.
5. Az ismételt centrifugálás során kapott felülúszót új Eppendorf-csőbe pipettáztuk, és 0,5ml 8M LiCl oldatot adtunk hozzá. Finom összerázást követően 4°C-on inkubáltuk a mintát az RNS kicsapódásáig (általában egy éjszakán át).
6. A kicsapódott RNS-t a 3. pont paramétereit szerint centrifugáltuk.
7. A kapott csapadékot 200µl nukleázmentes vízben oldottuk.
8. Az oldott RNS-hez 20µl 3M Na-acetát puffert (pH=4,8) és 660µl 96%-os etanolt adtunk, és ismét az RNS kicsapódásáig inkubáltuk 4°C-on.
9. A kicsapódott RNS-t a 3. pont paramétereit szerint centrifugáltuk.
10. A centrifugálás csapadékát 300µl 70%-os etanollal mostuk, majd ismét centrifugáltuk a 3. pont paramétereit szerint.

11. A felülúszó eltávolítása után jégen szárítottuk a kicsapódott RNS-t, az alkohol teljes mennyiségének elpárolgásáig.
12. A nagy tisztaságú RNS-t 80µl nukleázmentes vízben vettük fel, és -80°C-on tároltuk.

Az izolálás termékeként nagy tisztaságú, hozzávetőleg 3000ng/µl koncentrációjú RNS oldatot kaptunk, amely alkalmas további molekuláris biológiai vizsgálatokra.

A kvalitatív ellenőrzést agaróz gélelektroforézissel (1,5% agaróz gél; konstans feszültség), a kvantitatív elemzést pedig NanoDrop készülék segítségével végeztük (260 nm).

5.4.2 cDNS szintézise (reverz transzkripció)

A műveletet ebben az esetben is DNáz és RNáz mentes, steril eszközökkel az steril körülmények közt végeztük.

A szintézishez *Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*-et használtunk, amely minden szükséges oldatot tartalmazott.

A jobb áttekinthetőség végett a cDNS szintézis lépéseit pontokba szedve mutatjuk be:

1. Egy Eppendorf-csőben összemértünk 3µg-nyi, általunk készített templát RNS oldatot, 1µl Oligo(dT) (0,1nM/µl) primert, majd a 12µl-es végtérfogathoz szükséges mennyiségű nukleázmentes vizet adtunk hozzá.
2. Az Eppendorf-csöveket pár másodperces centrifugálással lepörgettük, majd 5 percig 65°C-on inkubáltuk a mintákat. Az inkubáció végeztével jégen hűtöttük a keveréket.
3. A mintákhoz hozzáadtunk 4µl 5X Reaction Buffer-t, 0,5µl RiboLock RNase Inhibitor-t, 2µl dNTP Mix-et (10 mM/bázis) és 1µl RevertAid Reverse Transcriptase enzimet.
4. Az összeállított mixet kevertük, majd pár másodperces centrifugálással lepörgettük az Eppendorf-csöveket. Ezt követően 60 percen át 42°C-on inkubáltuk a mintákat.
5. A reakció terminációjának céljából az elegyet 70°C-os vízfürdőbe helyeztük 10 percre.

A kapott cDNS-ből 1µl szükséges egy 20µl-es végtérfogatú RT-PCR reakció kivitelezéséhez.

5.4.3 Real Time PCR kivitelezése

5.4.3.1 Felhasznált primerek

5.4.3.1.1 Az YLS8 (*housekeeping*) gén expressziójának mérése

Az YLS8 (mitózis protein) gén expressziója *A. thaliana*-ban oxidatív stressz során stabil, igen kis mértékben reagál a stresszhatásra⁵¹. Ezen tulajdonsága alkalmassá teszi az YLS8 gént viszonyítási alapként való felhasználásra a génexpressziós vizsgálataink során.

Primerek⁵²:

Forward Primer: 5' - T T A C T G T T T C G G T T G T T C T C C A T T T - 3'

$T_m = \sim 61^\circ\text{C}$

Reverse Primer: 5' - C A C T G A A T C A T G T T C G A A G C A A G T - 3'

$T_m = \sim 62^\circ\text{C}$

5.4.3.1.2 Az AOX1a gén expressziójának mérése

Oxidatív stressz során az alternatív oxidázokat kódoló gének közül az AOX1a válasza a leggyorsabb és a legerélyesebb, így alkalmas lehet a harpin által kiváltott stressz nyomon követésére²⁸.

Primerek²⁸:

Forward Primer: 5' - C C G A T T T G T T C T T C C A G A G G - 3'

$T_m = \sim 62^\circ\text{C}$

Reverse Primer: 5' - G C G C T C T C T C G T A C C A T T T C - 3'

$T_m = \sim 63^\circ\text{C}$

5.4.3.1.3 A GLDH gén expressziójának mérése

A GLDH az egyik legfontosabb enzim (szintéziszáró) az aszkorbinsav szintézise során, így vizsgálata fontos információkkal szolgálhat az aszkorbinsav szintjének/redox státuszának változásainak magyarázatához.

Primerek (saját tervezésű):

Forward Primer: 5' – C C C A G T G G A T G C A T A C A A C A A – 3'

$T_m = \sim 63^\circ\text{C}$

Reverse Primer: 5' – G T G G T G G A G A C T G G G A A G A G – 3'

$T_m = \sim 64^\circ\text{C}$

5.4.3.1.4 A VTC2 és VTC5 gének expressziójának mérése

A VTC2 és közeli homológja, a VTC5 szintén fontos szerepet játszik az aszkorbát szintézisében (lásd 3.1.3.1.1.1), így vizsgálata kiemelt jelentőséggel bírhat a növényi stresszválasz megértésében.

Primerek ¹⁹:

VTC2:

Forward Primer: 5' - C A A T G T T A G T C C G A T A G A G T A T G G - 3'

$T_m = \sim 61^\circ\text{C}$

Reverse Primer: 5' - T G T A A C C G A G T C T G A A G T A T G G - 3'

$T_m = \sim 62^\circ\text{C}$

VTC5:

Forward Primer: 5' - A A T G T G A G T C C G A T T G A G T A T G G - 3'

$T_m = \sim 62^\circ\text{C}$

Reverse Primer: 5' – A G T A A G C C T G A A A G T G A A G A T G G - 3'

$T_m = \sim 63^\circ\text{C}$

5.4.3.2 A reakció paraméterei

A minták előkészítése:

A PCR-rel elemzett mintákat *Bioline SensiFAST SYBR No-ROX Kit* segítségével készítettük el. A kitben található *SensiFAST SYBR No-ROX mix (2x)* tartalmazza a reakció kivitelezéséhez szükséges összes komponenst (dNTP, puffer, polimeráz), a specifikus primereken és a templát cDNS-en kívül. A reakció során keletkező DNS mennyiségének fluoreszcens módon történő detektálást a SYBR Green festék tette lehetővé.

A 20 µl végtérfogatú PCR minta összetétele:

SensiFAST SYBR No-ROX mix (2x)	10µl
Forward Primer (10µM)	0,8µl
Reverse Primer (10µM)	0,8µl
Templát cDNS	1µl
Nukleázmentes víz	7,4µl

A vizsgálatok során az alábbi PCR programot használtuk:

I.	elődenaturáció	95°C	3 min
II. (40ciklus)	denaturáció	95°C	30 sec
	primer tapadás+polimerizáció	60°C	30 sec
	ciklusonkénti detektálás		
III.	olvasásgörbe (<i>melt curve</i>) analízis	95°C-53°C	0,3°C/lépés
	detektálás		3 sec/lépés
IV.	termék hõn tartása	4°C	∞

Az olvasásgörbe analízis beiktatása a PCR termékek ellenõrzése miatt szükséges. Segítségével megállapítható, ha nem (csak) az általunk elvart specifikus termék keletkezik. Ezzel a problémával az általunk használt primerek és reakcióparaméterek mellett nem találkoztunk.

A méréseket három párhuzamos minta alkalmazásával végeztük. A normálás minden esetben az adott lombik 0 időpontjában vett minta eredményével történt.

5.4.4 Az aszkorbát-glutation ciklus (FHA-ciklus) enzimaktivitás mérése

Az extrakciót követően az enzimaktivitás méréseket *Thermo Scientific Multiskan GO* plate reader segítségével végeztük 25°C-on, 200µl végtérfogat alkalmazásával. Az eredmények normálását a minták fehérjetartalma alapján végeztük.

5.4.4.1 Extrakció az aszkorbát-glutation ciklusban (FHA-ciklus) részt vevő enzimek aktivitásának meghatározásához

A -80°C-on tárolt, folyékony nitrogénben feltárt mintákhoz 1ml extrakciós puffert (50mM MES pH=6; 2mM CaCl₂; 40mM KCl; 1mM aszkorbát (frissen hozzáadva)) adtunk, majd vortex segítségével homogenizáltuk a mintákat, ezután centrifugáltuk (16.000 g, 20 perc, 4°C) a homogenizátumokat. A kapott felülúszóból azonnal mértük az enzimaktivitásokat. A mérés során folyamatosan jégen tartottuk a mintákat. A normáláshoz szükséges fehérjetartalom meghatározásához félre kellett tenni hozzávetőleg 50µl extraktumot. A normáláshoz szükséges fehérjemérést az 5.2.3.1 pont szerint végeztük, vak oldatként extrakciós puffert alkalmazva.

5.4.4.2 Aszkorbát peroxidáz (APX) aktivitás meghatározása

Reakciópuffer: 50mM kálium-foszfát puffer (pH=7)
1,2mM aszkorbát (közvetlenül a mérés előtt hozzáadva)

Kinetikus fotometriás mérés (vizsgálat időtartama: 3 perc):

Hullámhossz: 290 nm → **Asc mennyiségének csökkenése; $\epsilon = 2,8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$**

Reakciókeverék összetétele:

Minták: 20µl minta + 170µl puffer + 10µl H₂O₂ (254mM)

Kontroll: 190µl puffer + 10µl H₂O₂ (254mM)

5.4.4.3 Monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDHAR) aktivitás meghatározása

Reakciópuffer: 50mM HEPES (pH= 7,6)
0,25mM aszkorbát
0,25 mM NADH

Kinetikus fotometriás mérés (vizsgálat időtartama: 6 perc):

Hullámhossz: 340 nm → **NADH mennyiségének csökkenése; $\epsilon = 6,22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$**

Reakciókeverék összetétele:

Minták: 10µl minta + 185µl puffer + 2,5µl aszkorbát-oxidáz (200U/ml)

Kontroll: 10µl minta + 190µl puffer (nem specifikus NADH oxidáció)

5.4.4.4 Dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR) aktivitás meghatározása

Reakciópuffer: 50mM HEPES (pH= 7)
0,1mM EDTA
25mM GSH
0,8mM DHA

Kinetikus fotometriás mérés (vizsgálat időtartama: 6 perc):

Hullámhossz: 265 nm → **Asc mennyiségének növekedése; $\epsilon = 14\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$**

Reakciókeverék összetétele:

Minták: 20 μl minta + 170 μl puffer + 10 μl DHA (8mM)
Kontroll: 190 μl puffer + 10 μl DHA (8mM)

5.4.4.5 Glutation-reduktáz (GR) aktivitás meghatározása

Reakciópuffer: 50mM HEPES (pH= 8)
0,5mM EDTA
0,25mM NADPH

Kinetikus fotometriás mérés (vizsgálat időtartama: 6 perc):

Hullámhossz: 340 nm → **NADPH mennyiségének csökkenése; $\epsilon = 6,22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$**

Reakciókeverék összetétele:

Minták: 30 μl minta + 160 μl puffer + 10 μl GSSG (20mM)
Kontroll: 30 μl minta + 170 μl puffer (nem specifikus NADPH oxidáció)

5.4.5 Mitokondrium izolálás és a GLDH enzimaktivitás mérése

5.4.5.1 Mitokondrium izolálása *A. thailana* szuszpenziós sejt kultúrából

A mitokondrium izolálása jelentős mennyiségű (min. 100g) sejt tömeget igényel a megfelelő mennyiségű és töménységű preparátum létrehozásához.

Az alkalmazott műveletek során a mintákat folyamatosan jégen tartottuk, a centrifugálási lépéseket 4°C-ra hűtött centrifugában végeztük, a felhasznált eszközöket pedig jégen hűtöttük a minta degradálódásának elkerülése végett.

5.4.5.1.1 Felhasznált oldatok

<i>izoláló puffer:</i>	450mM szacharóz	0,5mM EGTA
	1mM EDTA	0,2w/v% BSA
	0,6w/v% PVP 40	15mM MOPS
	50mM DTT	
	pH=7,4	
<i>mosópuffer :</i>	300mM szacharóz	1mM EGTA
	10mM MOPS	
	pH=7,2	
<i>reszuspendáló puffer:</i>	0,4M mannitol	1mM EGTA
	10mM MOPS	
	pH=7,2	

5.4.5.1.2 A mitokondrium izolálás menete

A jobb áttekinthetőség végett az izolálás menetét pontokba szedve mutatjuk be:

1. A sejteket szűrőpapír használatával, Büchner-tölcséren szűrtük, a sejt tömeg teljes kiszáradását elkerülve, majd egy előre tárazott bemérő csónakba helyezve megmértük a tömegét.
2. A szűrlethez kétszeres mennyiségű izoláló puffert adtunk, majd a feltárást Waring Blender homogenizátorral végeztük (3 x 15 sec) a blender folyamatos hűtése mellett.
3. A létrehozott homogenizátumot szűrővászonon szűrtük, majd centrifugacsövekbe töltöttük, és 15 percig 3000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk.

4. A centrifugálás után kapott felülúszót új centrifugacsövekbe töltöttük, majd 15 percig 17000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk, ezzel megszabadulva a mikroszóma és citoplazma szennyezéstől.
5. A felülúszó leöntése után a centrifugálás során nyert pelletet felfuszpendáltuk 1ml mosópufferben, majd az azonos típusú mintákat egyesítettük (poolozás), ezután szintén mosópufferrel feltöltöttük a centrifugacsöveket.
6. A poolozott mintákat 5 percig 3000 g-n, 4°C-on, centrifugáltuk a visszamaradt szennyezők eltávolítása érdekében.
7. A centrifugálás után nyert felülúszót új centrifugacsövekben 15 percig 17.000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk.
8. A keletkező pelletet 1ml reszuszpendáló pufferben vettük fel, majd a további tisztítás céljából háromlépcsős Percoll gradiensre helyeztük (18%, 23%, 40% Percoll tartalom), ezután vákuumban, 70000 g-n 45 percig centrifugáltuk 4°C-on.
9. A centrifugálás során elválík egymástól a mitokondrium és a peroxiszóma. A számunkra fontos mitokondrium a 23%-os és a 40%-os lépcső határán található, így az itt található részletet új centrifugacsőbe pipettáztuk.
10. A megfelelő minőségű preparátum eléréshez Percoll mentesíteni kell a mintákat, amelyet a minta mosópufferben történő többszöri felvételével és centrifugálásával (min. 4 alkalom; 12000 g, 10 perc, 4°C) végeztünk.
11. A végső centrifugálás (12000 g, 10 perc, 4°C) után nyert pelletet 500µl reszuszpendáló pufferben vettük fel, ezzel biztosítva a megfelelő ozmózisnyomással rendelkező környezetet a mitokondrium számára.
12. Az így nyert mitokondrium preparátum alkalmas a további vizsgálatok elvégzésére.

5.4.5.2 A GLDH enzimaktivitás mérése mitokondrium izolátumon

A mérést az 5.4.5.1 pontban ismertetett módon előállított mitokondrium preparátumból az izolálást követően azonnal elvégeztük, ezzel megelőzendő a minta degradálódását.

A jobb áttekinthetőség érdekében a GLDH enzimaktivitás menetét pontokba szedve mutatjuk be:

A citokróm c ox./red. spektrumeltolódásán alapuló kinetikus fotometriás mérés menete:

1. 1ml reszuszpéndáló pufferben (5.4.5.1.1) oldott oxidált citokróm c-hez (1,5mg/ml) 25 μ l 1%-os Triton-X oldatot, 10 μ l 100mM-os NaN₃ oldatot, majd 5 μ l mitokondrium preparátumot (5.4.5.1) adtunk, ezután UV-VIS spektrofotométerrel felvettük az alapvonalat $\lambda=550\text{nm}$ -en.
2. A reakció indításához 25 μ l galaktono-1,4-lakton oldatot adtunk a fenti keverékhez, majd 550nm-en vizsgáltuk redukált citokróm c mennyiségének növekedését ($\epsilon= 20\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
3. A GLDH enzimaktivitás normálásához szükséges fehérjetartalom meghatározását az 5.2.3.1 pontban ismertetett módszerrel, az 5.4.5.1 pont szerint előállított mitokondriumpreparátumból végeztük, vak oldatként reszuszpéndáló puffert alkalmazva.
4. Az értékelés során a reakció lineáris szakaszát vettük figyelembe, legalább egy perces időtartam alkalmazásával.

5.5 Aszkorbát szint és redox státusz vizsgálata HPLC-vel

5.5.1 A HPLC minták előkészítése, normálás

1. Az 5.3.2 pont szerint, 5%-os ecetsavban felvett mintákat 15000 g-n 20 percig centrifugáltuk 4°C-on.
2. A centrifugálás során nyert felülúszót új Eppendorf-csőbe pipettáztuk, majd mintánként két párhuzamost alkalmazva, 100µl-t HPLC mintatartókba mértünk.
3. A 2. pontban kimért párhuzamosok egyikéhez 10µl 10mM-os DTT-t adtunk, ezzel téve lehetővé a teljes aszkorbát mennyiség mérését. A DTT nélküli párhuzamos a minták redukált aszkorbát tartalmának meghatározására szolgált.
4. A 2. pontban visszamaradt csapadékot 1ml 8M-os Urea oldatban vettük fel, amelyből ismételt 15000 g-n, 20 percen keresztül, 4°C-on történő centrifugálás után keletkező felülúszót a fehérjetartalomra történő normáláshoz használtunk.
5. A normáláshoz szükséges fehérjetartalom meghatározást az 5.2.3.1 pontban ismertetett módszerrel végeztük, vak mintaként 8M Urea oldatot alkalmazva.

5.5.2 A HPLC mérés kivitelezése

A mérési körülmények ismertetése:

Kolonna:	Teknokroma C18 (töltet: fordított fázisú C18; d=5 µm)
Eluens:	0,1M NaH ₂ PO ₄ ; 0,2mM EDTA; pH=3,1 (foszforsavval állítva)
Injektált mennyiség:	50µl
Mérési idő mintánként:	30 perc (az aszkorbát jellemző retenciós ideje: 5 perc)
Detektálás:	UV-VIS detektor, 254 nm
Mintatartó hőmérséklet:	5°C
Alkalmazott standard-ek:	25µM; 50µM; 100µM; 200µM; vak oldat: 5% esetsav

Az adatok kiértékelése során a standardekre kapott csúcsterületek alapján kalibráltunk (a mérés során történő bomlást is figyelembe véve), majd a fehérjetartalomra történő normálást követően meghatároztuk a minták redukált és teljes aszkorbát tartalmát, ezáltal az aszkorbát redox státuszát is.

6 Eredmények és értékelésük

6.1 A kezelési koncentrációk beállítása

A biotikus stressz kiváltásra szolgáló (lásd 5.3) harpin kezelések megkezdése előtt elengedhetetlen volt a kísérletek során alkalmazandó elicitorok koncentrációinak meghatározása. Több kutatócsoport végzett hasonló kísérleteket, számos stressz hatást kiváltó fehérjével, amelyek adatai megfelelő kiindulási alapot biztosítottak számunkra^{46,50,53}.

Előzetes kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy *A. thaliana* szuszpenziós sejt kultúra kezeléséhez a leghatásosabb a 100nM feletti, de 200nM-t nem meghaladó harpin koncentráció. A 100nM elicitor koncentráció alatti kezelések során nem tapasztalható erőteljes válaszreakció az általunk vizsgált komponensekben, míg 200nM feletti koncentrációtartományban a kezelés valószínűleg már a vizsgálatok időtartama alatt sejthalálhoz vezet¹⁵.

Az általunk felhasznált két harpin fehérje, feltehetően szerkezeti különbségeik miatt, különböző koncentrációban vált ki intenzív sejt választ. HrpW_{pto} esetében 100nM, míg HrpZ_{pto} alkalmazásakor 150nM bizonyult hatásosnak.

6.2 A génexpressziós vizsgálatok eredménye

A relatív génexpressziós adatokat a mintavételezés ideje szerint csoportosítva ábrázoltuk, feltüntetve a kezelés típusát.

6.2.1 Az AOX génexpresszió vizsgálatának eredményei

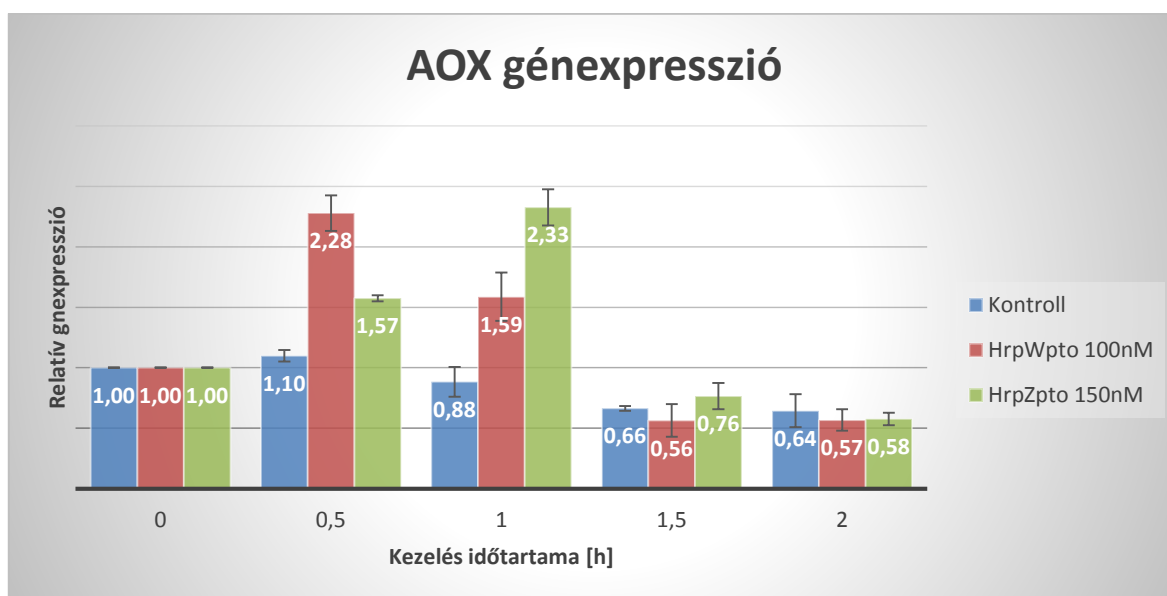
A mitokondrium belső membránjában található AOX (lásd 3.1.3.2) fontos szerepet tölt be az elektrontranszportlánc túlredukálódásának megelőzésében és a ROS eliminálásában, amely tulajdonsága teszi az oxidatív stressz egyik legfontosabb mitokondriális markerévé ^{3,54,55}.

Több kutatócsoport vizsgálta az AOX viselkedését oxidatív stressz során (lásd 3.1.3.2.1.3), és azt tapasztalták, hogy direkt módon hozzáadott reaktív oxigénvegyületek (pl.: H_2O_2), vagy az oxidatív kitörés során akumulálódó reaktív oxigénvegyületek hatására egyaránt jelentős expresszió növekedést produkál ^{3,54,56}.

A fenti adatok alapján számunkra is fontos információkkal szolgálhat az AOX expressziójának monitorozása, ezért vizsgálataink során kiindulási pontként szolgált.

Az általunk alkalmazott *in vitro* stressz rendszerben az AOX gyenge expresszió emelkedést mutat (10. ábra), amely eltért az irodalmi adatok alapján várttól¹⁵. A növekmény HrpW_{pto} esetén fél, míg HrpZ_{pto} alkalmazásakor a kezelés megkezdésétől számított egy óránál érte el maximumát, majd lecsengett.

Bár nagyobb expresszió növekményre számítottunk, egyes irodalmi adatok egybevágnak eredményeinkkel. Ilyen esetekben nagyobb O_2^- mennyiséget detektáltak az alacsonyabb expresszió mellett⁵⁷.

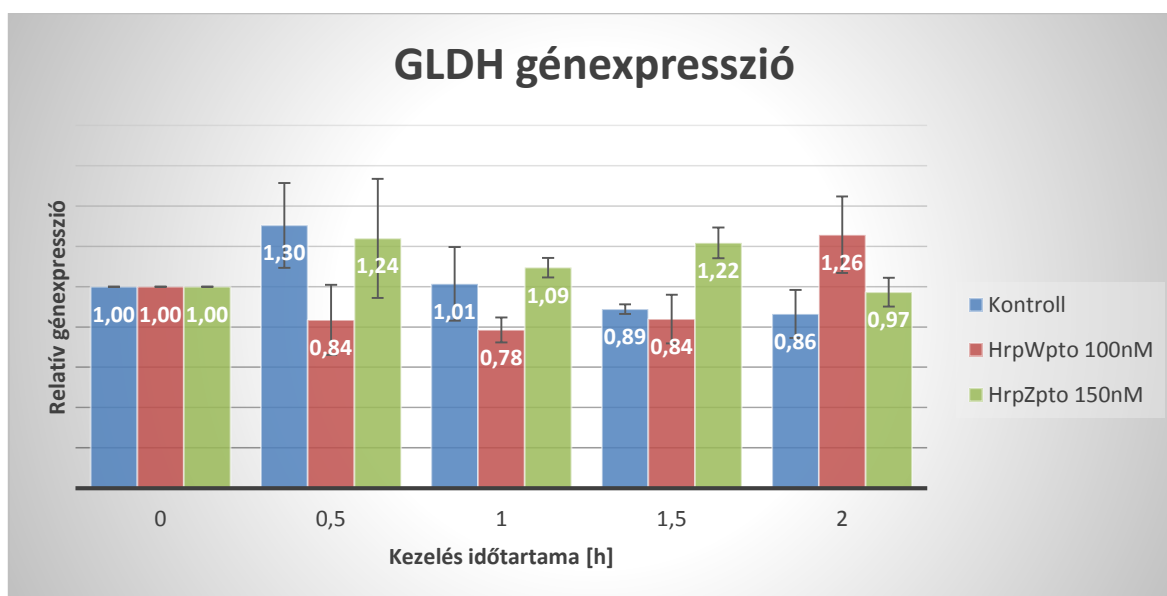


10. ábra: AOX génexpresszió. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.2.2 A GLDH génexpresszió vizsgálatának eredményei

Az aszkorbinsav (lásd 3.1.3.1.1.1) az egyik legfontosabb nem enzimatisz antioxiáns, mivel képes közvetlenül, illetve az APX elektrondonorjaként is részt venni a reaktív oxigénvegyületek redukciójában. Bioszintézisének (3. ábra) utolsó lépését a mitokondrium belső membránjában található GLDH enzim katalizálja, így expressziójának vizsgálata fontos információval szolgálhat a szintén elvégzett GLDH enzimaktivitás - és aszkorbát szint mérések (lásd 6.5 és 6.6) során nyert adatok értékeléséhez.

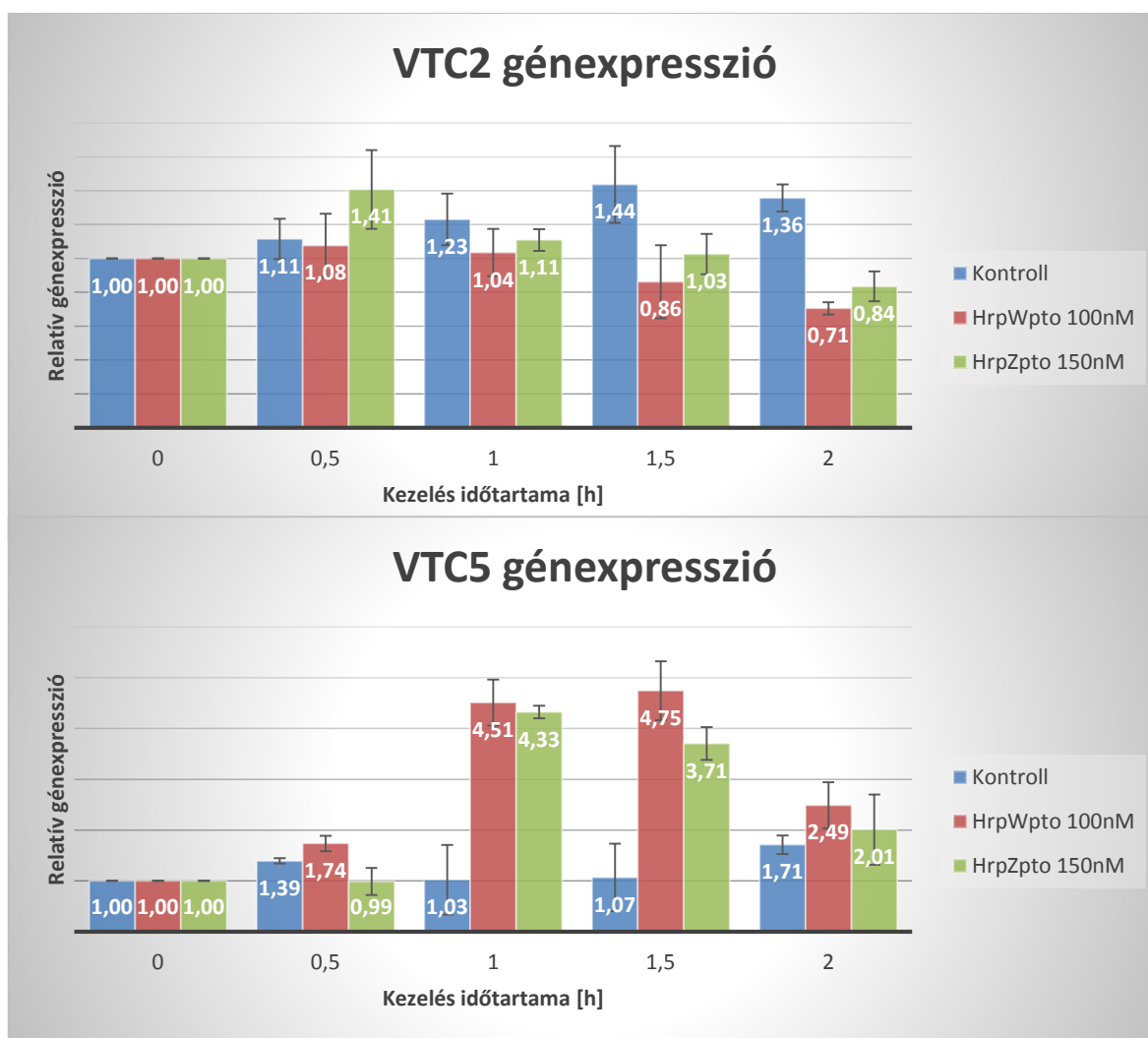
A kezelt sejt kultúrákban a GLDH expressziója nem mutat eltérést a kontrollhoz képest (11. ábra), amely egybeeseng a csoport korábbi kísérleteiben tapasztaltakkal és irodalmi adatokkal⁵⁸. Ezen megfigyelésünk, illetve a szintén előzetes kísérleteink során tapasztalt aszkorbát szint emelkedés helyezte előtérbe a GLDH enzimaktivitás vizsgálatának szükségességét, illetve a VTC2 és VTC5 enzimek génexpressziójának monitorozását. Szintén ez vezetett minket azon hipotézisünkhöz, hogy az aszkorbát szintézisben tapasztalható növekményre nem a GLDH transzkripcionális szabályozása gyakorol jelentős hatást az általunk kiváltott biotikus stressz során.



11. ábra: GLDH génexpresszió. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.2.3 A VTC2 és VTC5 génexpressziók vizsgálatának eredményei

A VTC2 és közeli homológja a VTC5 géntermékei katalizálják az aszkorbinsav szintézis (lásd 3.1.3.1.1.1) elkötelező, így feltehetően egyben sebességhatározó lépését (3. ábra) ^{59,60}. Több kutatócsoport vizsgálta a VTC2 és VTC5 gének expresszióit oxidatív stressz során, de sajnos együttes vizsgálatokról nem találtunk irodalmi adatokat. Stressz hatására megemelkedett VTC2 szintet figyeltek meg, míg VTC2 csendesített mutánsokban a VTC5 kompenzáló hatását írták le, amely szintén a génexpresszió jelentős, (akár nyolcszoros) emelkedésével járt ^{59,60}.



12. ábra: VTC2 és VTC5 génexpresszió. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

Vizsgálataink megállapították, hogy a két gén viselkedése nagy mértékben eltér egymástól (12. ábra). A VTC2 nem mutatott jelentős változást a kezelés során, ezzel szemben a VTC5 expressziója mind a kontroll, mind a VTC2 génkifejeződéséhez képest jelentősen megemelkedett a kezelés megkezdése utáni egy-másfél órában, majd visszaesett a kezdeti állapot közelébe.

A fentiek alapján feltételezzük, hogy a VTC5 jelentős szerepet tölt be a stresszválasz kialakítása során, amely szerep pontos felderítése további vizsgálatokat igényel, ezzel hozzájárulva a válaszreakció természetének megértéséhez.

6.3 Az aszkorbát-glutation ciklusban részt vevő enzimek aktivitásvizsgálata

Az aszkorbinsav regenerációjában fontos szerepet játszó aszkorbát-glutation ciklus (lásd 3.1.3.1.3) enzimei emelkedett aktivitást mutatnak oxidatív stresszben ^{58,61}, ezért vizsgálatuk esetünkben is hasznos információkkal szolgálhat.

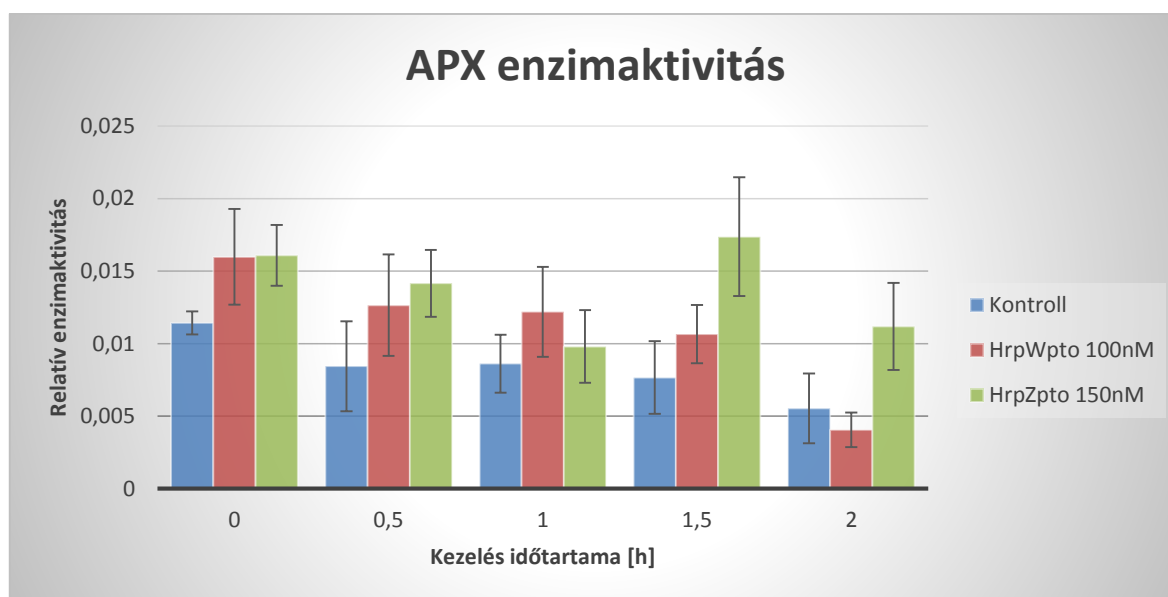
A diagramokon feltüntetett nulla időpontok mintavételezése - hasonlóan a génexpressziós vizsgálatokhoz - az elicitor hozzáadása után hozzávetőleg egy perccel történt. Az értékelés során az enzimaktivitás változások gyors mivolta miatt - ellentétben az expresszió vizsgálatokkal ⁵⁹ - már a nulla időpontban is érzékelhető lehet a kezelés hatása. A fentiek alapján a normálás során nem tekintettük egységnyinek a nulla időpontbeli enzimaktivitásokat, mivel ez elfedné az esetleges igen gyors sejtválaszt.

Az enzimaktivitási adatokat a mintavételezés ideje szerint csoportosítva ábrázoltuk, feltüntetve a kezelés típusát.

6.3.1 Aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimaktivitás

Az aszkorbát-peroxidáz aktivitása közvetlenül az elicitor hozzáadása után megemelkedik, majd az elicitor függvényében változik (13. ábra). A HrpW_{pto} esetében az aktivitás folyamatosan csökken, míg a HrpZ_{pto} esetében ciklikusság észlelhető, egy óránál található mélyponttal, amely után határozott emelkedés figyelhető meg, majd ismételt csökkenés játszódik le.

Az APX arányaiban főként csökkenő aktivitásának hátterében az oxidatív kitörés során keletkező H₂O₂ gátló hatása állhat ²¹.

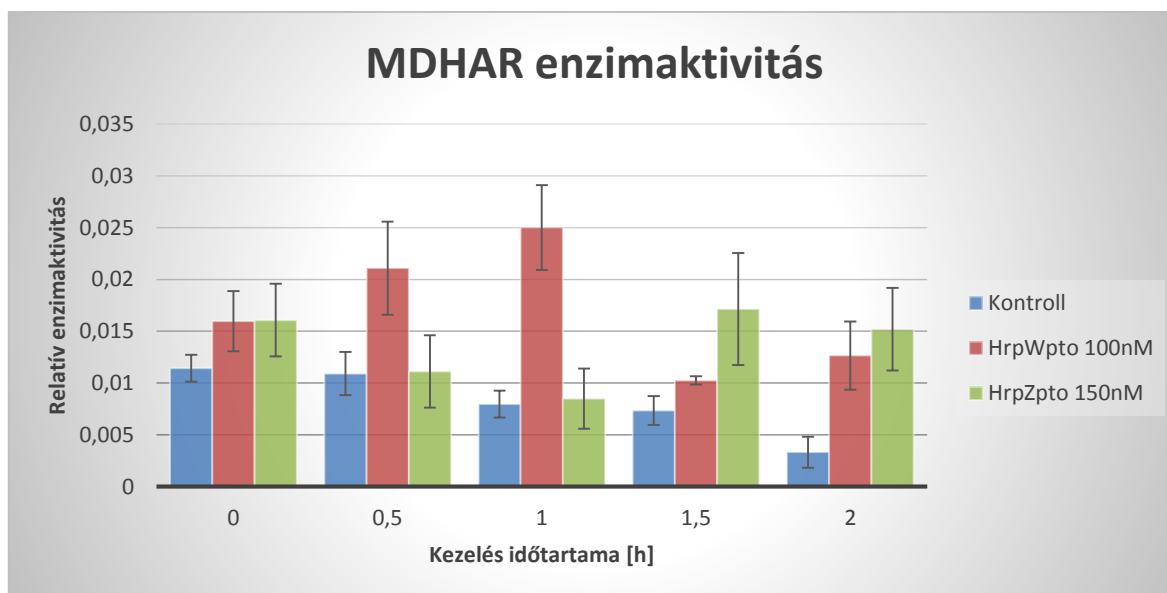


13. ábra: APX enzimaktivitás. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.3.2 Monodehidroaszskorbát-reduktáz (MDHAR) enzimaktivitás

A monodehidroaszskorbát-reduktáz esetében jelentősebb különbségek alakulnak ki a kontrollhoz képest (14. ábra). Az APX-nél megfigyelhető ciklikusság itt is felfedezhető, ráadásul mindkét harpin esetén. A HrpW_{pto} által kiváltott aktivitás növekmény egy óránál tetőzik, majd 2 óránál ismételt – bár kisebb mértékű – emelkedést mutat. A HrpZ_{pto} esetén a reakció kezdeti szakasza megegyezik, ám ezt csökkenés követi, majd az ismételt növekedés másfél óránál következik, amely lecsengése feltehetően két óránál meg is kezdődik.

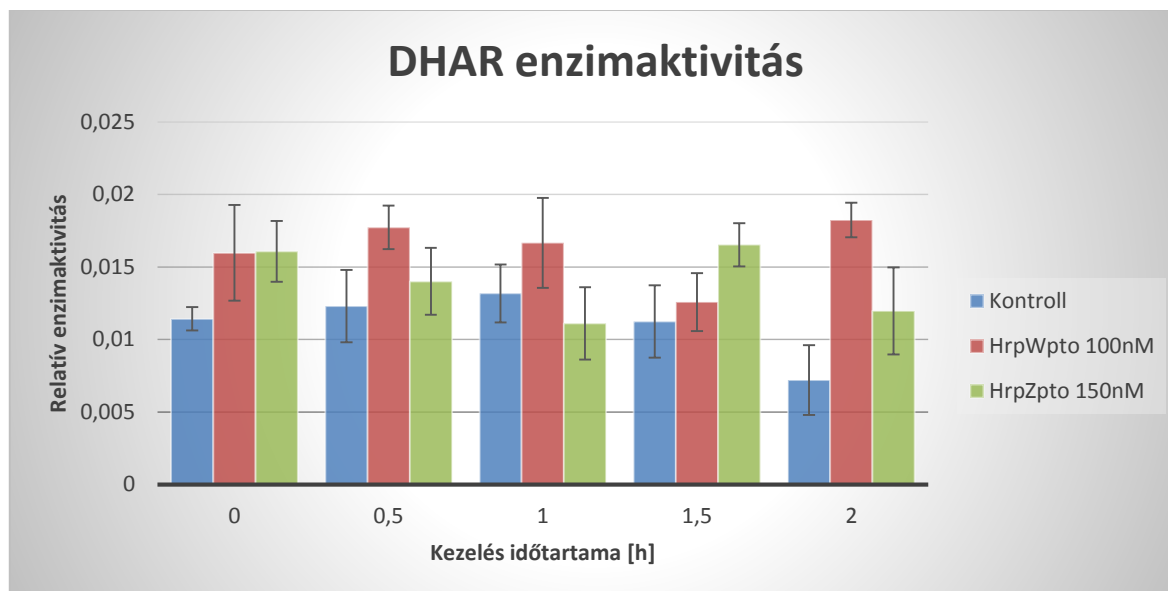
Az aszkorbát-glutation ciklus enzimeit közül az MDHAR mutatja a legnagyobb aktivitás emelkedést, amellyel feltehetően tehermentesíti a ciklus további enzimeit. Ezen hipotézisünk magyarázhatja a DHAR és GR esetén tapasztalható kisebb mértékű aktivitás növekedést.



14. ábra: MDHAR enzimaktivitás. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.3.3 Dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR) enzimaktivitás

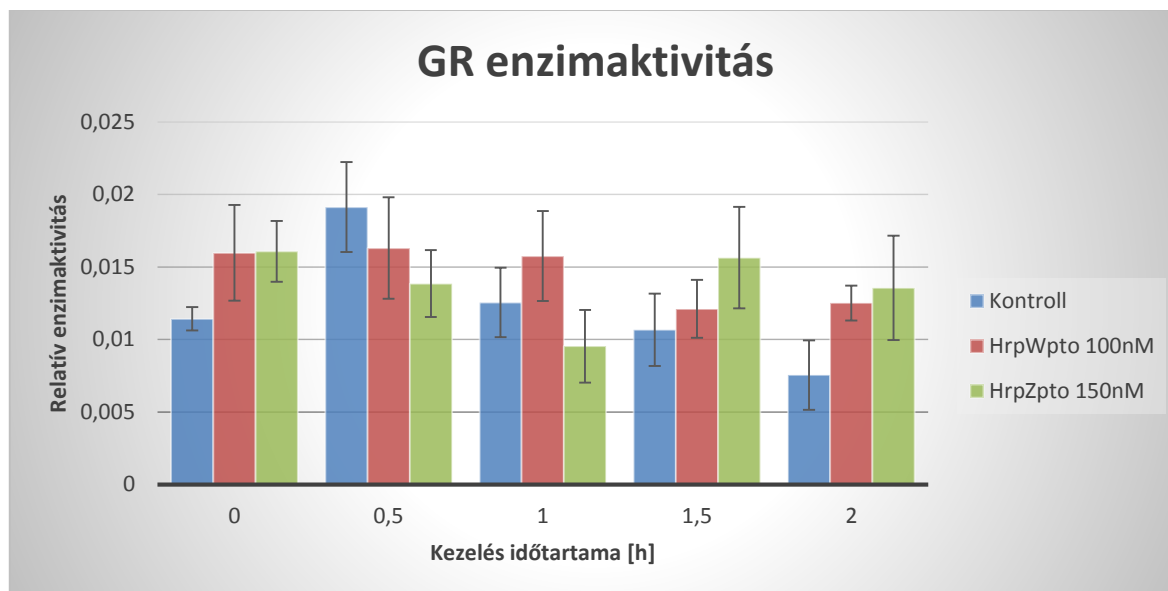
A dehidroaszorbát-reduktáz aktivitásának változása igen hasonló a fent bemutatott MDHAR-hoz, de mértéke kisebb (15. ábra). Mindkét elicitor ciklikus aktivitás változást idéz elő, amely kezdetben igen hasonló, majd a HrpZ_{pto} alkalmazása esetén időben eltolva jön létre a HrpW_{pto}-hoz képest.



15. ábra: DHAR enzimaktivitás. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.3.4 Glutation-reduktáz (GR) enzimaktivitás

Az aszkorbát-glutation ciklus enzimeit közül a glutathion-reduktáz mutatta a legkisebb reakciót a kezeléseinkre (16. ábra). Ez esetben is megfigyelhető a fenti két enzim (DHAR és MDHAR) esetén leírt ciklikusság, de ahogy fent említettük, eltérésük a kontrolltól nem tekinthető jelentősnek.



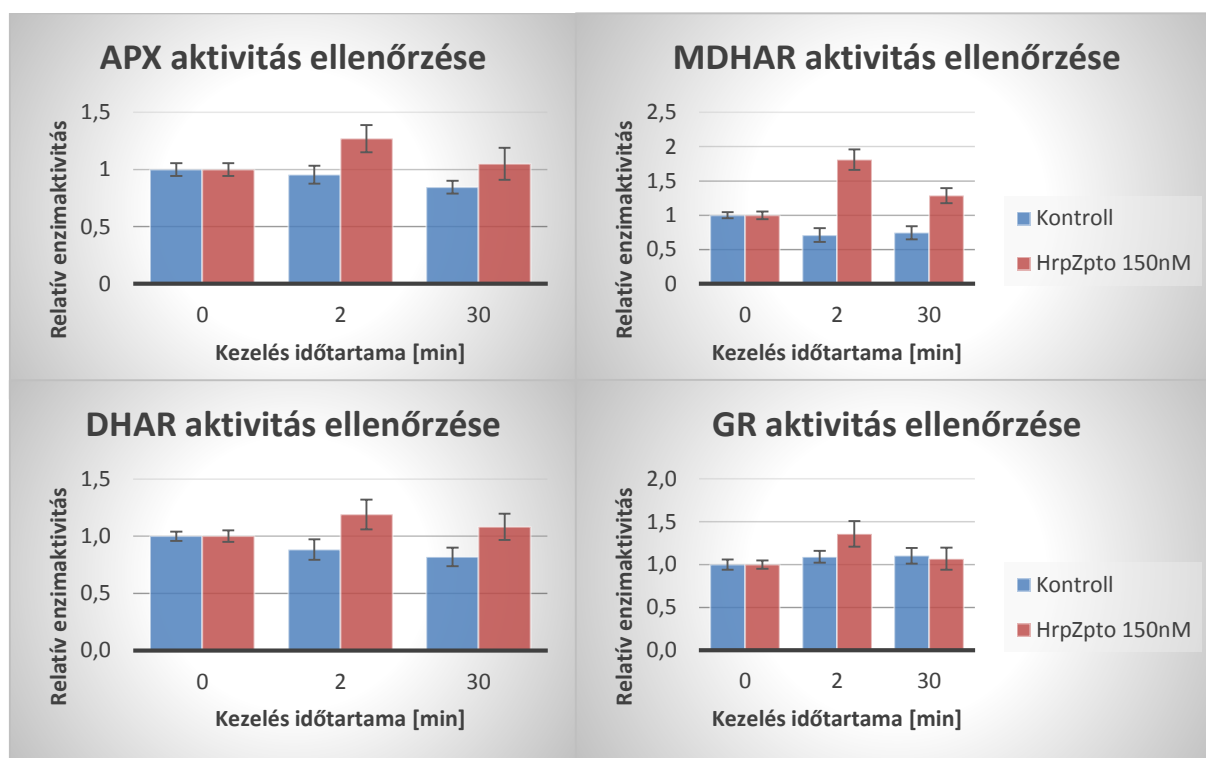
16. ábra: GR enzimaktivitás. A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.4 Az aszkorbát-glutation ciklus gyors enzimatiskus válaszreakcióinak igazolása

A fent bemutatott aktivitásvizsgálatokban (lásd 6.3) a nulla időpontban ábrázolt minták eltérése a kontrolltól igen gyors válaszreakciót feltételez, amely igazolásra szorul.

A fent leírtak miatt olyan, mitokondrium izolálással egybekötött kezeléseket végeztünk, amelyekben az elicitor hozzáadása előtt is történt mintavételezés. Az abszolút nulla időpontban történő mintavétel lehetővé teszi az enzimaktivitások egységre történő normálását, ezzel eltüntetve a vizsgált lombikok közt fennálló esetleges különbségeket, így téve pontosabbá a nyert adatokat.

A kísérletek során mintát vettünk az elicitor hozzáadása előtt, majd két perccel a kezelés megkezdése után. Az enzimaktivitási adatokat a fenti mérésekhez hasonlóan a mintavételezés ideje szerint csoportosítva ábrázoltuk, feltüntetve a kezelés típusát.



17. ábra: Az aszkorbát-glutation ciklust alkotó enzimek válaszsebességének vizsgálata - A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

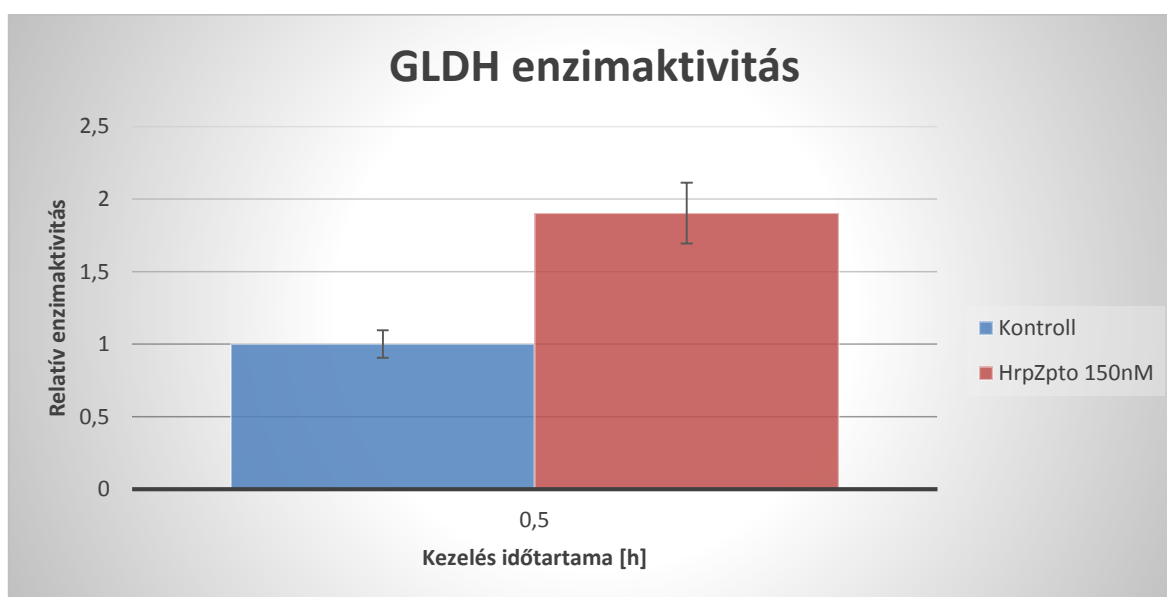
A fenti diagramok alapján (17. ábra) magabiztosan kijelenthető, hogy az enzimaktivitás változás gyorsaságáról tett feltételezésünk (lásd 6.3) helytálló volt, a válaszreakció már két perccel a kezelés megkezdése után mérhetővé válik. Ennek háttérében feltehetően valamilyen redox-aktív tiolcsoport általi, poszttranszlációs módosítás állhat, amelyhez hasonló GLDH esetén már leírtak ⁶².

6.5 A GLDH enzimaktivitás vizsgálat eredménye

A GLDH aktivitását befolyásolja a mitokondriális elektronáram, amely oxidatív stressz során megváltozik²⁰, így aktivitásáról nem nyilatkozhatunk pusztán a génexpressziós adatok alapján (6.2.2 fejezet). Indokolt az enzim aktivitásának vizsgálata. A 6.2.2 pontban, illetve az előzetes kísérleteink során tapasztalt változatlan GLDH expressziós szint miatt kíváncsian vártuk az enzimaktivitás mérések eredményeit.

Az előző pontban (lásd 6.4) bemutatott vizsgálatokkal egybekötve a kezelés harmincadik percében mitokondrium izolálást végeztünk, és mértük a GLDH aktivitását.

Jól látható (18. ábra), hogy a GLDH aktivitása közel kétszeresére emelkedik a kontrollhoz képest, amely eredmény támogatja a 6.2.2 pontban megfogalmazott feltételezésünket, miszerint az aszkorbát szint növekmény háttérében a GLDH tekintetében nem transzkripcionális szinten történő reguláció áll, hanem feltehetően az ismertetett szabályozóelem, a mitokondriális elektronáram játszhat kulcsszerepet^{20,62}.



18. ábra: GLDH enzimaktivitás - A feltüntetett szórások három biológiai párhuzamosból származnak

6.6 Az aszkorbát szint és redox státusz vizsgálatának eredményei

Több pontban hangsúlyoztuk az egyik legfontosabb nem enzimatisz antioxiáns, az aszkorbinsav (lásd 3.1.3.1.1.1) szerepét, így kísérleteink során nélkülözhetetlen az aszkorbát szint és redox státusz vizsgálata.

Az aszkorbát szintet és redox státuszt hat független kezelés során követtük nyomon. A kapott adatok nem mutattak jelentős eltérést, ezért az ellenőrző mérések (lásd 6.4) során nyert adatokat is együtt ábrázoltuk a többi eredménnyel. Az ellenőrző mérés kontroll mintájának nulladik és második percében nyert adatok az aszkorbát mérés kontroll nulladik, míg a kezelt minták adatait a kezelésnek megfelelő nulladik és harminc perc elteltével kapott adataival egyesítettük, mint biológiai párhuzamost.

Az alábbi diagram alapján (19. ábra) elmondható, hogy az enzimaktivitás mérések során tapasztaltakhoz hasonlóan az aszkorbát szint is ciklikus változást mutat. A kezdeti stádiumban mindkettő elicitor hatására emelkedett aszkorbát szintet mértünk, amely a HrpW_{pto} esetén minimális növekedést mutat a kezelés első órájának végéig, majd a kontroll közelébe esik vissza. A HrpZ_{pto} által kiváltott biotikus stressz a kiindulási aszkorbát mennyiségéhez képest közel a kontroll szintjéig való csökkenést eredményez egy óra elteltével, majd fél óra múltán ismét minimális emelkedést mutat. A két órás időpontban tapasztalt eltérés egyik harpin esetén sem jelentős.



19. ábra: Az aszkorbát szint vizsgálata - A feltüntetett szórások a 0 és 0,5 időpontban hat, a további időpontokban három biológiai párhuzamosból származnak

Az aszkorbát redox státuszát tekintve (20. ábra) nem számolhatunk be jelentős változásról, az arányok az egész kezelés során követik a kontroll mintáknál tapasztaltakat. Ennek oka feltehetően az aszkorbát bioszintézisében, illetve az aszkorbát-glutation ciklusban részt vevő enzimek megnövekedett aktivitása, amely biztosította a közel fiziológiás redox státusz fenntartását.



20. ábra: Az aszkorbát redox státuszának vizsgálata - A feltüntetett szórások a 0 és 0,5 időpontban hat, a további időpontokban három biológiai párhuzamosból származnak

A 6.2.3 pontban bemutatott VTC5 expresszió növekedés a kezelés hatvanadik és kilencvenedik percében vett mintáknál nem jár a teljes aszkorbát szint hasonló mértékű növekedésével, amely szintén elmondható a 0 pontban bemutatott GLDH enzimaktivitás növekményről a harmincadik percben. Ennek ellenére kölcsönhatásuk fontos szerepet játszhat a megfelelő aszkorbát szint kialakításában az általunk kiváltott stressz válasz során.

7 Összefoglalás

Növényi sejtekben biotikus stressz során az egyik legkorábbi sejtválasz az oxidatív kitérés, amely során megemelkedik a reaktív oxigénvegyületek mennyisége. Ezen vegyületek a patogén közvetlen károsításán kívül védekezési mechanizmusok beindítására szolgáló szignálként is funkcionálnak, de nagy reaktivitásuknak köszönhetően károkat is okozhatnak a gazdasejtben. Ezen ártalmas hatások csillapítására szolgálnak az antioxidánsok, amelyek egyik legfontosabb nem enzimikus képviselője az aszkorbinsav.

Munkánk során arra kerestük a választ, miként változik biotikus stressz során az aszkorbinsav mennyisége és redox státusza, valamint bioszintézisének feltehetően sebességhatározó lépését katalizáló VTC2 és VTC5 enzimek, illetve a bioszintézis utolsó lépését katalizáló GLDH expressziója, ezen felül monitoroztuk az aszkorbát reciklásáért felelős, aszkorbát-glutation ciklusban részt vevő enzimek és a szintéziszáró GLDH aktivitását. Vizsgáltuk továbbá a mitokondrium oxidatív károsodásának megelőzésében kiemelt szerepet játszó alternatív oxidáz génexpressziójának változásait.

Kísérleteink során általunk termelt és tisztított elicitor hatású harpin fehérjével kezeltünk *Arabidopsis thaliana* szuszpenziós sejt kultúrákat. A kezelések során mintákat vettünk, majd megfelelő előkészítésük után HPLC használatával mértük a redukált és totál aszkorbát tartalmukat, RT-PCR-rel génexpressziós vizsgálatokat végeztünk, valamint fotometriás módszerekkel nyomon követtük a GLDH és az aszkorbát-glutation ciklusban résztvevő enzimek aktivitását.

Az alternatív oxidáz mint általános stresszmarker vizsgálatával meggyőződhattünk arról, hogy valóban sikerült kiváltani az oxidatív stresszt, bár a vártnál kisebb mértékű expresszió növekedést tapasztaltunk.

Az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek aktivitásmérése során nyert adatok szerint közvetlenül a kezelés után megugrik az enzimek aktivitása, majd ciklikusan változik. Ez a gyors reakció feltehetően valamilyen redox-aktív poszttranszlációs módosításnak köszönhető.

Megfigyeltük továbbá, hogy a kezelt sejtekben megemelkedik az aszkorbát mennyisége, de redox státusza állandó marad. Az aszkorbát szint emelkedésének hátterében valószínűleg a VTC5 expressziójának, valamint a GLDH aktivitásának növekedése áll, míg a redox státusz állandóságát az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek fokozott aktivitása biztosíthatja.

A fentiek alapján bizonyítottnak tűnik, hogy a vizsgált harpin fehérjék képesek a növényi immunválasz kiváltására, amely fokozza a valódi patogénekkal szembeni ellenálló képességet, ezzel támogatva a növényvédelemben történő alkalmazásuk lehetőségének létjogosultságát. További vizsgálatok tapasztalataival, illetve más elicitor hatású harpin fehérjék tesztelésével előállíthatóvá válhatnak olyan környezetbarát biopeszticidek, amelyek alternatívaként szolgálhatnak a manapság használatos, környezetre káros kemikáliák helyett.

8 Irodalomjegyzék

1. De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S. & de Pinto, M. C. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **173 Suppl**, S13–9 (2010).
2. Bhattacharjee, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J. Bot.* **2012**, 22 (2012).
3. Apel, K. & Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373–99 (2004).
4. Foyer, C. H. & Noctor, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 861–905 (2009).
5. Scandalios, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **38**, 995–1014 (2005).
6. Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. & Dunand, C. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 195–204 (2010).
7. Gill, S. S. & Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–30 (2010).
8. Foyer, C. H. & Noctor, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* **119**, 355–364 (2003).
9. Schmitt, F.-J. *et al.* Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 835–48 (2014).
10. Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C. & Siedow, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* **141**, 357–66 (2006).
11. Tripathy, B. C. & Oelmüller, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* **7**, 1621–33 (2012).
12. Bhattacharjee, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Curr. Sci.* **89**, 1113–1121 (2005).
13. Triantaphylidès, C. *et al.* Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol.* **148**, 960–8 (2008).
14. Del Río, L. A., Sandalio, L., Corpas, F., Palma, J. M. & Barroso, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* **141**, 330–335 (2006).

15. Krause, M. & Durner, J. Harpin inactivates mitochondria in Arabidopsis suspension cells. *Mol. plantmicrobe Interact. MPMI* **17**, 131–139 (2004).
16. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**, 312–22 (2006).
17. Bartoli, C. G., Pastori, G. M. & Foyer, C. H. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* **123**, 335–44 (2000).
18. Noctor, G. & Foyer, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249–279 (1998).
19. Zhang, W., Lorence, A., Gruszewski, H. a, Chevone, B. I. & Nessler, C. L. AMR1, an Arabidopsis gene that coordinately and negatively regulates the mannose/l-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* **150**, 942–50 (2009).
20. Millar, A. H. *et al.* Control of Ascorbate Synthesis by Respiration and Its Implications for Stress Responses 1. **133**, 443–447 (2003).
21. Asada, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601–639 (1999).
22. Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, A. C., Last, R. L. & Dangl, J. L. LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **12**, 1022–6 (1999).
23. Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. & Foyer, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* **53**, 1283–304 (2002).
24. Zechmann, B. & Müller, M. Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* **246**, 15–24 (2010).
25. Rasmusson, A. G. & Møller, I. M. in *Plant Physiol. Online* (2011).
26. Maxwell, D. P., Wang, Y. & McIntosh, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8271–6 (1999).
27. Maxwell, D. P., Nickels, R. & McIntosh, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.* **29**, 269–79 (2002).
28. Rasmusson, A. G., Soole, K. L. & Elthon, T. E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 23–39 (2004).

29. Geisler, D. A., Johansson, F. I., Svensson, A. S. & Rasmusson, A. G. Antimycin A treatment decreases respiratory internal rotenone-insensitive NADH oxidation capacity in potato leaves. *BMC Plant Biol.* **4**, 8 (2004).
30. Vidal, G. *et al.* Lack of respiratory chain complex I impairs alternative oxidase engagement and modulates redox signaling during elicitor-induced cell death in tobacco. *Plant Cell* **19**, 640–55 (2007).
31. Djajanegara, I. *et al.* Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol. Biol.* **50**, 735–42 (2002).
32. Xie, Z. & Chen, Z. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**, 183–90 (2000).
33. Peng, J.-L. *et al.* Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 genes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 317–326 (2003).
34. Pogson, B. J., Woo, N. S., Förster, B. & Small, I. D. Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.* **13**, 602–9 (2008).
35. Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. & Miller, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant. Cell Environ.* **35**, 259–70 (2012).
36. Torres, M. A., Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**, 373–8 (2006).
37. Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322** (Pt 3), 681–92 (1997).
38. Tsuda, K. & Katagiri, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 459–65 (2010).
39. De Wit, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2726–32 (2007).
40. De Pinto, M. C., Tommasi, F. & De Gara, L. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* **130**, 698–708 (2002).
41. Cvetkovska, M. & Vanlerberghe, G. C. Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in *Nicotiana tabacum*. *Plant. Cell Environ.* **35**, 1121–36 (2012).
42. Livaja, M., Palmieri, M. C., von Rad, U. & Durner, J. The effect of the bacterial effector protein harpin on transcriptional profile and mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteomics* **71**, 148–59 (2008).

43. Livaja, M., Zeidler, D., von Rad, U. & Durner, J. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**, 161–71 (2008).
44. Hueck, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433 (1998).
45. Büttner, D. & He, S. Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* **150**, 1656–64 (2009).
46. Reboutier, D. *et al.* The HrpN(ea) harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**, 94–100 (2007).
47. Reape, T. J. & McCabe, P. F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* **15**, 249–56 (2010).
48. United States Environmental Protection Agency. Messenger: a promising reduced risk biopesticide. *PESP (Pesticide Environ. Steward. Program)* **3**, (2000).
49. Choi, M.-S., Kim, W., Lee, C. & Oh, C.-S. Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**, 1115–22 (2013).
50. Kvitko, B. H., Ramos, A. R., Morello, J. E., Oh, H.-S. & Collmer, A. Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J. Bacteriol.* **189**, 8059–72 (2007).
51. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. & Scheible, W.-R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 5–17 (2005).
52. Remans, T. *et al.* Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* **227**, 1343–9 (2008).
53. Reboutier, D. *et al.* Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* **120**, 3271–8 (2007).
54. Sweetlove, L. J. *et al.* The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.* **32**, 891–904 (2002).
55. Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J. H. & de Melo, D. F. AOX--a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci.* **11**, 281–7 (2006).

56. Zhang, L., Oh, Y., Li, H., Baldwin, I. T. & Galis, I. Alternative oxidase in resistance to biotic stresses: *Nicotiana attenuata* AOX contributes to resistance to a pathogen and a piercing-sucking insect but not *Manduca sexta* larvae. *Plant Physiol.* **160**, 1453–67 (2012).
57. Cvetkovska, M. & Vanlerberghe, G. C. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant. Cell Environ.* **36**, 721–32 (2013).
58. Zsigmond, L. *et al.* Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 809–15 (2011).
59. Urzica, E. I. *et al.* Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the VTC2 gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **287**, 14234–45 (2012).
60. Hou, H. M. *et al.* Expression of a GDP-L-galactose phosphorylase-like gene in a Chinese wild *Vitis* species induces responses to *Erysiphe necator* and defense signaling molecules. *Genet. Mol. Res.* **12**, 3830–44 (2013).
61. Zhang, J. & Kirkham, M. B. Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Sci.* **113**, 139–147 (1996).
62. Leferink, N. G. H., van Duijn, E., Barendregt, A., Heck, A. J. R. & van Berkel, W. J. H. Galactonolactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant Physiol.* **150**, 596–605 (2009).

Köszönetnyilvánítás

A dolgozatunk elkészítéséhez szükséges munkákat a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki karán végeztük, az Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Molekuláris biológiai laboratóriumában.

Köszönettel tartozunk a laboratórium összes munkatársának, akik készséges és pozitív hozzáállásukkal segítették a munkánkat.

Kiemelten köszönjük témavezetőnknek, Dr. Szarka Andrásnak aki tanácsaival, folytonos iránymutatásával, és pozitív de kritikus hozzáállásával segítette a dolgozat elkészültét.

Köszönet illeti Dr. Wunderlich Líviust, aki hasznos tanácsaival és meglátásaival segített a felmerülő nehézségeink megoldásában, valamint Csécsy Katalint a preparatív munkákban nyújtott segítségért.