

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A poliamin katabolizmus folyamatainak vizsgálata
gátlószerek segítségével sóstressznek kitett paradicsom
növényekben

Hurton Ágnes

Biológus Msc, 2. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológia Tanszék

Témavezető: Dr. Szepesi Ágnes, egyetemi adjunktus
SZTE Növénybiológiai Tanszék

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
1.1. A sóstressz	5
1.2. A poliaminok jellemzése	5
1.3. Poliaminok homeosztázisa	7
1.3.1. A poliamin szintézis	7
1.3.2. Poliamin katabolizmus	8
1.3.3. Poliamin konjugátumok.....	11
1.3.4. Poliaminok, mint stressz szignál molekulák.....	11
1.4. A poliaminok szerepe az abiotikus stresszválaszban	12
1.5. A poliaminok sóstresszben betöltött szerepe.....	13
1.6. Az aminoguanidin, mint DAO gátlószer (?).....	15
1.7. A NADPH-oxidáz, és a difenilén-jodónium (DPI)	16
2. Célkitűzések	18
3. Anyagok és módszerek.....	19
3.1. A vizsgált növények nevelési paraméterei	19
3.1.1. Növények nevelési paraméterei, alkalmazott kezelések.....	19
3.2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek	19
3.2.1. A DAO (EC 1.4.3.6) és PAO (EC. 1.5.3.14) katabolikus enzimek aktivitásának mérése.....	19
3.2.2. H ₂ O ₂ fotometriás meghatározása.....	20
3.2.3. Szabad poliaminok analízise	20
3.2.4. Az életképesség meghatározása FDA segítségével	21
3.2.5. NO meghatározás DAF-FM DA festékkel	21
3.2.6. Szuperoxid gyökanion detektálása	22
3.2.7. Összes ROS vizsgálata	22
3.2.8. Statisztikai analízis	23
4. Eredmények és értékelésük	24
4.1. A rövidtávú sóstressz hatása a poliaminok lebontására.....	24
4.1.1. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H ₂ O ₂ szint változása az idő függvényében paradicsom hajtásban	24
4.1.2. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H ₂ O ₂ szint változása az idő függvényében paradicsom gyökérben	24

4.1.3. A szabad poliamin szintek meghatározása sókezelt paradicsom hajtásokban az idő függvényében	25
4.2. Az aminoguanidin (AG) és difenilén-jodónium (DPI) gátlószerek hatása a paradicsom növények poliamin katabolizmusára rövidtávú sóstressz esetén	25
4.2.1. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H_2O_2 szint változása AG és DPI kezelt paradicsom hajtásokban	25
4.2.2. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H_2O_2 szint változása AG és DPI kezelt paradicsom gyökérben	26
4.2.3. A szabad poliamin szintek meghatározása sókezelt paradicsom hajtásokban AG és DPI kezelést követően	27
4.2.4. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának életképességére	29
4.2.5. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának szuperoxid gyökanion tartalmára.....	29
4.2.6. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsainak NO tartalmára	30
4.2.7. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának összes ROS tartalmára	31
5. Összefoglalás	32
6. Irodalomjegyzék	34
7. Köszönetnyilvánítás	41
8. Függelék	42
9. Tételes szakmai hozzájárulás	43

Rövidítések jegyzéke

ABA- abszcizinsav

AG- aminoguanidin

ADC- arginin-dekarboxiláz

AO- amin-oxidáz

AR- Amplex Red

Cad- kadaverin

DAO- diamin-oxidáz (EC 1.4.3.6.)

DAF-FM DA- 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein

Dap- diaminopropán

DHE- dihidroetídium

DPI- difenilén-jodónium

FDA- fluoreszcein-diacetát

H₂DC-FDA- 2,7-dikloro-dihidrofluoreszcein-diacetát

HOCl- hipoklórossav

JA- jázmonsav

NOX- NADPH-oxidáz (EC 1.6.3.1.)

ODC- ornitin dekarboxiláz (EC 4.1.1.17)

PA- poliamin

PAO- poliamin-oxidáz (EC 1.5.3.11.)

Put- putreszcin

Rboh- Respiratory burst oxidase homolog

Rop- Rho-like protein

ROS- reaktív oxigénformák (Reactive Oxigen Species)

SA- szalicilsav

Spd- spermidin

SPDS- spermidin-szintáz

Spm- spermin

SPMS- spermin-szintáz

TCA- triklórecetsav

1. Bevezetés

1.1. A sóstressz

A talaj magas sótartalma a világ sok részén az egyik legnagyobb probléma a mezőgazdaságban, főként az arid és szemi-arid klímájú területeken, ahol rendkívül magas az oldott sótartalom a talajban (főleg NaCl), a csapadékviszonyok és az evaporáció felborult egyensúlya miatt. Több mint 800 millió hektárnyi terület érintett, vagy a sótartalom vagy pedig a szikesedés által, ami a világ földterületeinek 6%-át teszi ki. A jelenlegi 230 millió hektár terület, 20 %-a érintett. Ezen terület a művelésbe vont földek 15%-át teszi ki, azonban ezen a 15%-on termelik a világ élelmiszereinek 1/3-át. A magas sótartalom megzavarja a növények intracelluláris ion homeosztázisát, ami membrán destabilizációhoz vezet, ami csökkenti a metabolikus aktivitást, mely végül kihat a növények növekedésére. Ezen felül a só hatással van nemcsak a sejtmembránok integritására, hanem a különböző enzimaktivitásokra és a fotoszintetikus apparátus folyamataira is (Fariduddin és mtsai., 2012).

A sóstressz kétféle módon hat a növényekre, egyrészt hat a növény ozmotikus viszonyaira (ozmotikus stressz), másrészt pedig felborítja a sejt ionos állapotait (ionos stressz) (Munns és Tester, 2008). A sóstressz hatására másodlagos reaktív oxigénformák keletkeznek, melyek oxidatív stresszhez vezetnek.

A sóstressz kivédésében azonban számos tényező részt vesz, melyek közül az egyik legfontosabb a poliaminok homeosztázisa, mellyel munkánk során foglalkoztunk.

1.2. A poliaminok jellemzése

A poliaminok (PA) kis szerves polikationok, melyek majdnem minden egysejtűben, és szabadon élő mikrobában megtalálhatóak, kivéve néhány metanogén és halofil archeát. A poliaminok az élő szervezetekben általánosan előfordulnak, így a növényekben, az állatokban és egyéb más élőlényekben is. A legfontosabb poliaminok közé tartozik a diamin putreszcin (Put), a triamin spermidin (Spd), illetve a tetramin spermin (Spm).

A *Bryophyta*, *Pteridophyta*, nyitvatermő és gomba taxonok taxonómiai markereiként ismertek a norspermidin, norspermin és a homospermin PA-k (Hamana és Matsuzaki 1985). A PA-k megtalálhatóak az összes növényi sejt-kompartimentumban, beleértve a sejtmagvacskát is, amely a sejt különböző alapvető folyamatokban való részvételéért

felel (Galston és mtsai., 1997). A poliaminok kötött és konjugált állapotban is előfordulnak sejtben belül, azonban a legtöbbet vizsgált a szabad poliaminok szintje.

A poliaminok olyan alifás aminok, melyek szerepet játszanak sok molekuláris alapfolyamatban, mint például a DNS replikáció, a transzkripció, a transzláció, a sejtosztódás, enzimaktivitások regulációja, a sejtszintű anion-kation egyensúly fenntartása és a membránstabilitás (Groppa és Benavides, 2008). Kulcsszerepet játszik a növény élettani- és fejlődési folyamataiban, pl. a sejtosztódás szabályozásában, az embriogenezisben, a morfogenezisben (Handa és Mattoo, 2010), a pollen életképességében, az öregedés folyamataiban, a termésérésben, és felelős a biotikus és abiotikus stresszre adott válaszokban (Groppa és Benavides, 2008). Antioxidáns és védő szerepe van, a nukleinsavak szerkezetének és funkciójának szabályozásán keresztül fenntartja az intracelluláris pH-t és a membrán integritását (Groppa és mtsai, 2008).

A növényekben betöltött szerepük hasonlít a hormonokéhoz, azonban nem tekintendők hormonnak (Pandey és mtsai., 2000), mert a növényi PA koncentráció (10^{-9} - 10^{-5}) sokkal magasabb, mint a fitohormonoké (10^{-13} - 10^{-7}). A teljes PA koncentráció és az egyes PA-ok aránya jelentősen változik növényfajonként, szövetenként, és fejlődési fázisonként is (Bhatnagar és mtsai., 2001).

A poliaminok vizsgálata egy nagyon dinamikusan fejlődő terület, melyet a poliaminokkal foglalkozó tudományágban, havonta nagy számban megjelenő cikkek sora is bizonyít (beleértve a növénybiológiát, az emberi egészségtudományt és a mikrobiológiát is), mellyel a világ minden táján dolgozó laboratóriumok sora foglalkozik. Azonban még így is maradnak felfedezetlen területek, melyek olyan értékes és érdekes témává teszik a poliaminokat növénybiológiában.

Meggyőző bizonyítékok azt mutatják, hogy a poliaminoknak szerepük van a növényi biotikus és abiotikus stresszválaszokban, sőt már kísérletek is bizonyították, hogy a poliaminok segítettek a biotikus és abiotikus stressz rezisztencia kialakulásában. Megfontolandó, hogy érdemes a poliamin katabolikus útvonalakat vizsgálni, miként segíthetik a mezőgazdaságot az olyan mai kihívásokkal szemben, mint a klímaváltozás, a tápanyaghiány, különböző abiotikus stresszek, vagy a talaj magas sótartalma (Alcázar és mtsai., 2014).

1.3. Poliaminok homeosztázisa

1.3.1. A poliamin szintézis

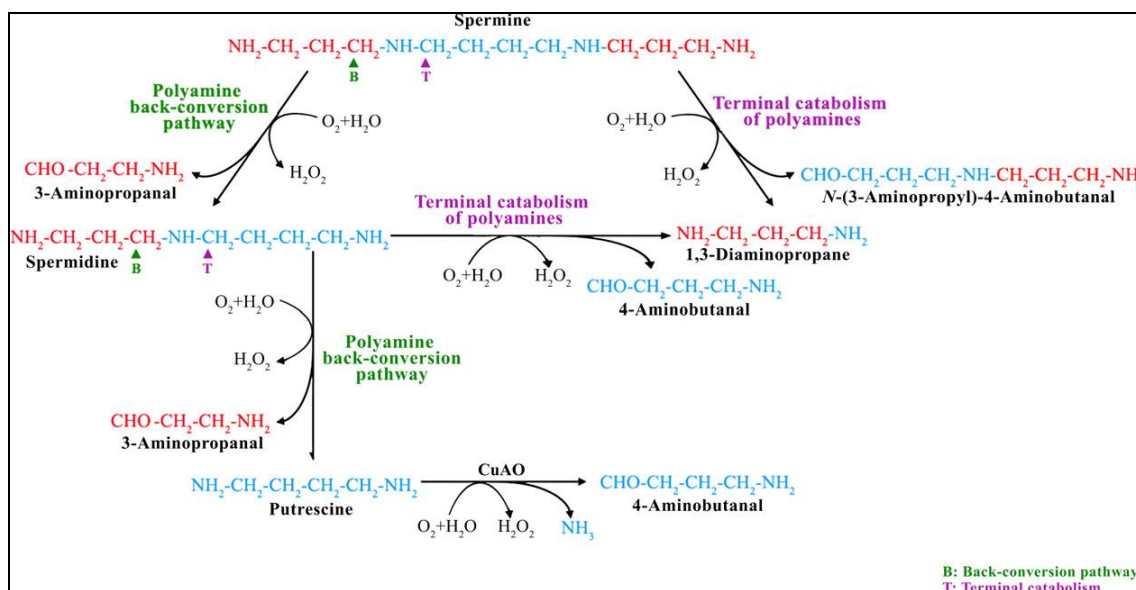
Az eukarióta organizmusokban a három PA (Put, Spd, Spm) L-argininből (L-ornitinen keresztül) és L-metioninből szintetizálódik hat, egymástól függő enzimreakciók sorozatával (Alcázar és mtsai., 2010). Argininből kiindulva ornitinen keresztül diammin putreszcín szintetizálódik az argináz (EC 4.1.1.17) és az ornitin-dekarboxiláz (ODC, EC 4.1.1.17) enzim segítségével. Put agmatinon keresztül is szintetizálódhat 3 egymást követő reakciót követően, amit az arginin-dekarboxiláz (ADC, EC 4.1.1.19), agmatin iminohidroláz (AIH EC 3.5.3.12), és N-karbamoil putreszcín aminohidroláz (CPA, EC 3.5.1.53) enzimek katalizálnak. Put egyesül a dcSAM (dekarboxilált S-adenozilmetionin) aminopropil részével (mely az S-adenozilmetionin dekarboxiláz (SAMDC, EC 4.1.1.50) által jött létre), az Spd-szintáz (EC 2.5.1.16) Spd-t szintetizál, majd a Spm-szintáz (EC 2.5.1.22) a második aminopropil-transzferáz reakcióval Spm-t szintetizál (Oshima 2007).

A két szintetáz konstitutívan termelődő, stabil enzim, melyek homodimer formában aktívak, mindkettő regulátora a szubsztrátjuk hozzáférhetősége (Slocum 1991).

A Spd-szintázok röntgen analízise és a szekvenciák összehasonlítása Spm-el és termospermin-szintázal azt mutatta, hogy a GGGDG konzervált aminosavszekvenciák Spd- és Spm-szintáz dekarboxilált S-adenozilmetionin kötőhelye. A dekarboxilált S-adenozilmetionin aminopropil rész amino-csoportjának ionikus kölcsönhatása az aszpartátnak köszönhető, ez a termospermin-szintáz szekvenciájában glutamátra cserélődik. A jövőbeni kutatások a termospermin-szintáz élettani szerepére deríthetnek fényt.

A PA és az etilén bioszintézis S-adenozilmetionin közös prekursoron osztoznak. Bár sok bizonyíték azt sugallja, hogy ha a PA, vagy az etilén bioszintézist megnövelik, akkor az a másikat gátolni fogja, bár ez még mindig vitatott tény.(Cohen, 1998).

1.3.2. Poliamin katabolizmus



1. ábra: A poliamin katabolizmus folyamatai (Riccardo és mtsai., 2010. alapján)

A PA-ok lebontó anyagcseréjéért felelős enzimek: a réztartalmú diamin-oxidáz (DAO; EC 1.4.3.6.), és a flavin-tartalmú poliamin-oxidáz (PAO, EC 1.5.3.11.) (Cona és mtsai., 2006). A PAO-ból származó H₂O₂ szükséges a sejtfaléréshez, valamint a sztómányitódás szignáljaként szolgál, és a programozott sejthalálban (PCD) is szerepe van (Angelini és mtsai., 2010).

Az amin-oxidázok (AO) a poliaminok oxidatív deaminációját katalizáló enzimek. Az egyik amin-oxidáz enzim a réz tartalmú DAO, a másik pedig a flavin-tartalmú PAO. Az egyik kiemelt fiziológiai szerepe ezeknek a fehérjéknek, a kompartment specifikus H₂O₂ szintézis a differenciálódás különböző fázisaiban, illetve a biotikus, és az abiotikus stressz elleni védekező mechanizmusokban. Több tanulmány is kimutatta, hogy az amin-oxidázok expressziója összefüggésben áll az olyan élettani szakaszokra jellemző metabolikus intenzitással, mint a sejtosztódás, szervfejlődés; ezen kívül a poliaminok sejten belüli szintjének szabályozása által szerepe lehet a sejtciklus szabályozásában (Angelini és mtsai., 2010).

A réztartalmú DAO a Put és Cad oxidatív deaminációját végzi. *Arabidopsis* 12 DAO-like gént tartalmaz (Alcázar és mtsai., 2006)

A DAO enzim homodimer, minden alegysége tartalmaz egy réz atomot és egy kinon kofaktort (Tipping és McPherson, 1995). Az enzim katalizálja a Put oxidációját 4-aminobutanallá, közben H₂O₂ és ammónia (NH₃) keletkezik, és a keletkezett aldehid

tovább alakul Δ^1 -pirrolinon keresztül γ -aminovajsavvá (GABA). A PAO enzim, amely az egyszikűekben magas szinten fordul elő, a Spd, Spm oxidációját segíti elő. A kukorica apoplasztikus PAO a legjobban ismert enzim, amely oxidálja a szenet a Spd, vagy Spm N⁴-nitrogén belső oldalán, FAD-kofaktort használva, 4-aminobutanal, 1,3-Dap és H₂O₂ keletkezik, amelyek részt vesznek a terminális lebontó útvonalban (Fincato és mtsai., 2011). PAO-k egy másik csoportja, amely hasonlít az emlős PAO-ra, Spm-Spd és Spd-Put visszaalakulást végzi, 3-aminopropanal és H₂O₂ keletkezése mellett Moschou és mtsai., 2008).

A DAO és a PAO a citoplazmában, növényi sejtfaon lokalizáltak, ahol H₂O₂-ot biztosítanak a szuberinizációhoz és a lignifikációhoz, amely szilárdságot ad a sejtfaonak (Cona és mtsai., 2003.). DAO enzim a primer amino-csoportok oxidációját katalizálja, a preferált szubsztátjai pedig a Put és a Cad (kadaverin). A DAO működése során H₂O₂, amino-aldehidek és ammónia keletkezik melléktermékként. PAO a szekunder aminocsoportok oxidációját katalizálja, szubsztátjai a Spd, Spm, közben H₂O₂, 1,3-Dap (diaminopropan), és amino-aldehidek keletkeznek.

A növényi PA-ok másodlagos metabolitok (nikotin és tropán alkaloidok) prekursorainak szubsztátjaiként szolgálnak, amelyek bőségesen jelen vannak a *Solanaceae* családban (Leete, 1980). Minden PA-oxidáló enzim H₂O₂ keletkezését generálja (Cona és mtsai., 2006)

A *Fabaceae* és *Gramineae* családban a DAO és a PAO enzimek apoplasztikus lokalizációjuk. Nemrég azonban felfedezték több taxonban, hogy DAO és PAO enzimek intracelluláris kompartmentumokban figyelhetők meg (Planas-Portell és mtsai 2013).

Spm-oxidáz (SMO), egy FAD-dependens amin-oxidáz biztosítja Spm visszaalakulását Spd-re, ezzel együtt 3-aminopropanal és H₂O₂ keletkezik, mutatták ki emlős sejtekben (Wang és mtsai., 2001) és élesztőben (Fms1; Landry és Sternglanz, 2003). A növényekben található egyik katabolikus útvonal 1,3-Dap-ot, Δ^1 -pirrolint, a megfelelő aldehidet, és H₂O₂-t produkál, de képtelen Spm-t Put-né visszaalakítani (Alcázar és mtsai., 2006). A FAD-dependens PA-oxidázok Spd-t és Spm-t állítanak elő. Az első leírt PAO, amelyet kukoricasejtek apoplasztijából izoláltak, ZmPAO, amely egy 53 kDa-os monomer glikoprotein, egy molekula FAD-ot tartalmaz (Tavladoraki és mtsai., 1998). Az oxidáció végtermékeként keletkező 1,3-Dap szubsztátja lehet a DAO-katalizált β -alanin formálásában.

A. thaliana-ban 3 PAO gént, (AtPAO2, AtPAO3, AtPAO4) peroxiszómában lokalizáltak, míg a másik kettőt (AtPAO1 és AtPAO5) citoszolikus proteinnek feltételeznek. Palans-Portell és mtsai (2013) 3 DAO gént (Atlg62810, Atlg31710, At2g42490) vizsgáltak *Arabidopsis*-ban. Eredményeik azt mutatták, hogy ezek a gének különböző lokalizáltságú DAO-kat kódolnak.

GABA transzaminálódhat és oxidálódhat borostyánkőssavvá, amely belép a Krebs-ciklusba (Flores és Filner, 1985). Put lebontásából származó szén és nitrogén újrahasznosítását biztosítja.

Moschou és mtsai. (2008) *in silico* analizálta az öt PAO *Arabidopsis* gént, és PAO3-at (AtPAO) azonosította, nem tipikus PAO-ként, más, ismert PAO homológia alapján. AtPAO3 gént túlexpresszáltatva *E. coli*-ban tovább vizsgálta szerepét. AtPAO3 katalizálta az egymást követő Spm Spd, illetve Spd Put konverziót/oxidációt, ily módon bizonyította a funkcionális homológiát az emlős PAO-okkal. Spd-t mutatták ki az útvonal legjobb szubsztrátjaként, míg Spm és Spd N¹-acetyl-származékai kevésbé hatékony szubsztrátoknak bizonyultak. Másrésztől semmilyen aktivitást nem észleltek, mikor diamin (agmatin, kadaverin, Put) szubsztrátokat használtak. Potenciális PAO inhibitorral, guazatinnal gátolható volt. AtPAO3 egy peroxiszómális fehérje, amelynek C-terminusa tartalmazza a válogató (sorting) információt.

Mindezen ismeretek birtokában, a növényeknek és emlősöknek hasonló PA oxidációs rendszere van, beleértve a szubcelluláris elhelyezkedést, és a funkciót is.

Ono és mtsai. (2012) hét PAO izomrát izoláltak *Oryza sativa* növényből. OsPAO szubsztrátként Spd-t részesített előnyben, majd termospermint és Spm-t, és teljes PA visszaalakulást mutatott. OsPAO4 szubsztrátspecifitása hasonló OsPAO5-höz, Spm-t és termospermint, de Spd-t nem preferált. Hasonló eredményre jutottak Moshou és mtsai (2008), OsPAO3 lokalizációját peroxiszómában határozták meg.

A poliaminok nem csak szabad formában vannak jelen a növényekben. Növényi PA-ok képesek konjugátumokat alkotni, ilyen pl. a hidroxifahéjsav konjugátum. Magas PA konjugátum található a magvakban, mint a csíranövény N-tartaléka, amely annak fejlődésére használ fel (Facchini és mtsai., 2002). Míg a PA-kat gyakran végterméknek, és akkumulált terméknek tekintik, emellett azonban metabolikus köztitermékként hozzájárul a fenolos metabolizmus komplexitásához, és az N-metabolizmussal való kapcsolatához (Bassard és mtsai., 2010).

1.3.3. Poliamin konjugátumok

PA konjugátumok hozzájárulnak a sejtfal megerősítéséhez, valamint a patogének és ragadozók elleni közvetlen toxicitás kivédésében, a beépített, vagy az indukálható védekezésben (Moschou és mtsai, 2012). Bár sok irodalom szól a szabad poliaminok katabolizmus/visszaalakulási folyamatairól, mégis igazán keveset tudunk a konjugált PA-ok körfolyamatáról. Habár a tapétum rétegben AtPAO3 és AtPAO5 együtt expresszálódik (Fincato és mtsai., 2012), szerepet játszanak a különböző PA konjugátumok bioszintézisében, valószínű, hogy ezek a PAO-ok a konjugált PA-ok homeosztázisában meghatározóak (Moschou és mtsai., 2012).

A DAO és a PAO enzimek vizsgálata azt mutatta, hogy a DAO enzimatis aktivitása megnőtt szorosan összefüggve Put akkumulációjával, míg PAO aktivitása a Spd/Spm degradációval függ szorosan össze. (Filippou és mtsai., 2013).

1.3.4. Poliaminok, mint stressz szignál molekulák

A PA-oknak mindezen felül más funkciójuk is van a növényekben. A PA-ok celluláris szignálként is viselkedhetnek, mert hormonális utakkal is kapcsolatban vannak, így az abiotikus stressznél ABA szabályozásában is részt vesznek (Alcázar és mtsai., 2010). Spd úgy tűnik alapvető szerepet játszik a centrális dogma folyamataiban (Gupta és mtsai., 2012). Nagyon meglepő felfedezés, hogy három olyan különböző molekula, mint Spd, ABA és NaCl, különböző struktúráis felépítéssel, ugyanazt a foszforilációs szignált indíthatja el. Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a PA-ok fontos szerepet töltenek be az abiotikus stressz jelátvitelében is.

ABA és PA mellett más fontos résztvevői is vannak az abiotikus stressz szignalizációs hálózatban, például a jázmonsav (JA), Ca^{2+} , ciklikus nukleotidok, NO, cukrok, és szalicilsav (SA) (Bitrián és mtsai., 2012).

A PA katabolizmus H_2O_2 képződését generálja, melyet gyakran toxikus molekulaként emlegetnek. Emellett azonban szignál molekulaként is működik, könnyen átdiffundál a környező sejtekbe, szövetekbe, ezzel elindítva a különböző stresszekkel szembeni védekezést (Neill és mtsai., 2002). Tun és mtsai. (2006) PA-ok és NO közti kapcsolatot tisztázta. *Arabidopsis* csíranövényben arra jutott, hogy PA termelődés NO keletkezését indukálta.

A PA-ok, ABA, H_2O_2 és NO stresszválaszokban egy komplex hálózatot alkotnak. Megfigyelhető közös együttműködésük a növényi sztómaregulációban is (Alcázar és mtsai., 2010).

1.4. A poliaminok szerepe az abiotikus stresszválaszban

A PA-ok abiotikus stresszben betöltött szerepe nagyon jelentős, mivel stresszhatásra megemelkedik a szintjük, így sóstressz, savak által kiváltott stressz, szárazság-, hidegstressz esetén, valamint K^+ hiánynál is, így elősegítve az akklimatizációt.

Fariduddin és mtsai (2013) jól összefoglalták review cikkükben poliaminok szerepét sóstressz alatt. A poliaminok szintjének változása több tényezőtől függ, például a növényfajtól, a stresszel szembeni toleranciától, vagy rezisztenciától, és a stressz időtartamától is. Az exogén úton alkalmazott PA kezelés védelmet nyújtott az abiotikus stresszhatásoktól, míg a PA bioszintetikus géneket túltermelő transzgénikus növények stressztoleranciát mutattak. Másrésről a funkcióvesztéses PA bioszintézis géneket tartalmazó növények alacsonyabb stressztoleranciát mutattak. Az alábbiakban láthatunk ezekből néhány példát.

Az *SPMS*, *SPDS1*, *SPDS2* túltermeltetése dehidratáció és magas sótartalom mellett magasabb PA akkumulációt eredményezett. A sóstressz és az ABA stresszhormon kezelés indukálta a PA transzportot az apoplastban (Yoda és mtsai., 2003). A transzportált PA lehet Put, Spd, vagy Spm (Marina és mtsai., 2008).

A különböző növényi abiotikus stresszválaszokban született tanulmányok azt mutatták, hogy a növényi organelláris PA szintet a PA katabolitikus enzimek szabályozzák. A megemelkedett DAO és a PAO enzimek színjét különböző stresszállapotban figyelték meg (Moller és McPherson, 1998). Az abiotikus stressz okozta PA katabolizmus az apoplastban ROS-ok (Reactive Oxygen Species, reaktív oxigénformák) képződéséhez vezetett, H_2O_2 produkción keresztül, amely előidézi a downstream szignál kaszkádot, amely beindítja a különböző stressz érzékeny fehérjéket (Moschou és mtsai., 2008). A stresszhatásra PA katabolizmus során keletkező apoplastikus H_2O_2 programozott sejthalálhoz (PCD, programmed cell death) is vezethet. Utóbbi vizsgálatok arra utalnak, hogy az apoplastikus PA akkumuláció megváltoztatja a különböző ROS-ok közti egyensúlyt (Rodríguez és mtsai., 2009), vagy GABA akkumulációjához vezet (Xing és

mtsai., 2007) a DAO aktivitás serkentésén keresztül, hogy a növény továbbra is növekedjen sóstressz körülményei között (Dittami és mtsai., 2011). Mélyrehatóbb vizsgálatokra van szükség, hogy a stresszválaszokban a PA metabolizmus regulációját átfogóan megismerhessük (Takahashi és Kakehi, 2010).

Zapata és mtsai (2004) számolt be arról, hogy PA szintek a sótartalom mértékével változtak *Solanum esculentum*ban. Azt is megfigyelték, hogy a legtöbb esetben Put szintje csökkent, míg Spd és/vagy Spm szintje növekedett és a (Spd+Spm)/Put arány összefüggésben állt a sótoleranciával. Roy és mtsai. (2005) *Oryza sativa*ban szintén kimutatta, hogy Spd kezelés hatására a rizs növények plazmamembrán (PM) és a PM-kötött H^+ -ATP-áz tolerálta a sóstressz által indukált károsodásokat.

Több tanulmány azt mutatja, hogy Put szintézisben károsodott növények stresszre hiperszenzitívek (Urano és mtsai., 2004, Cuevas és mtsai., 2008). A szabad PA akkumuláció stressz alatt időtől és stressztől is függ. *Vitis vinifera*ban végzett kísérletek kimutatták, hogy só- vagy ozmotikus stresszhatásra Put szintje 1 nap után emelkedett meg, Spd és Spm szintje 3 nap után, sóstressznél, 5 nap után pedig ozmotikus stressznél.

A fő PA bioszintetikus enzim, ADC aktivitása megnőtt stresszhatásra, megemelve ezzel a PA szinteket (Galston és Sawhney, 1990, Liu és mtsai., 2006). A növények a stresszre adott válaszai összefügghetnek a PA-ok szintézisének képességével (Liu és mtsai., 2007). Bár a PA akkumuláció élettani jelentősége bizonytalan marad, ezért szükség van arra, hogy tovább vizsgálják, hogy ezek a válaszok stressz-indukált károk miatt indulnak be, vagy egy védekező válasz által kiváltott reakció az abiotikus stresszre (Hussain és mtsai., 2011).

1.5. A poliaminok sóstresszben betöltött szerepe

A PA-ok jelentőségét sóstressz alatt már számos tanulmányban leírták (Evans és Malmberg, 1989, Alcázar és mtsai, 2006, Liu és mtsai, 2007, Alcázar és mtsai 2010). A Put, Spd és Spm túlexpresszáltatása rizsben, dohányban, és *Arabidopsis*ban fokozta a sótoleranciát magas sóstressznél (Groppa és Benavides, 2008). A megemelkedett Spd jelenléte *Arabidopsis* virágban magas sókoncentráció mellett kiemelkedik a szabad poliaminok jelentősége a sótoleranciában (Tassoni és mtsai., 2008). A sóstressz alatti PA bioszintézis regulációját, illetve a DAO, PAO által regulált katabolizmus folyamatot

már számos növényben leírták, így *Arabidopsis*-ban (Cona és mtsai., 2006), zabban és paradicsom leveleken (Alcázar és mtsai, 2010).

A DAO és PAO működéséből eredő megemelkedett H_2O_2 szint aktiválta a sótoleranciában részt vevő védekező géneket (Moschou és mtsai, 2008). Kukoricában a sóstressz indukált PAO által genereált ROS beindította az adaptív válaszokat magas sótartalom mellett (Rodríguez és mtsai., 2009).

Feltételezhető, hogy a DAO és PAO aktivitás által indukált NO termelődés lehet a köztes válaszreakció a sótoleranciában. Egy korábbi tanulmány sószenzitív bab fajokon tisztázta, hogy PA kölcsönhat a hidroxil-gyökökkel ($\cdot OH$), majd aktiválja Ca^{2+} és K^+ transzportját a gyökér epidermális PM-okon keresztül. Velarde-Buendía és mtsai. (2012) kimutatták, hogy a PA-ok és ROS közötti kapcsolat széles genotípusos változatosságra kiterjedhet sóstressz alatt.

J. Corpas és munkatársai 2014-es cikkében a NO forrását keresték *Arabidopsis thaliana* gyökereiben sóstressz alatt. Munkájuk során DAF-FM DA-t használva a NO fő forrásának a peroxiszmákat találták. Sótstresszként 100 mM-os NaCl-t használtak. A megnövekedett NO-tartalom reakcióba lép O_2^- -al és $ONOO^-$ (peroxinitrit) keletkezik, ami a fehérjék Tyr nitrációjához vezet.

Jelenlegi élettani, biokémiai, és molekuláris tudásunk kibővítését megnehezíti, hogy a különböző PA-ok más-más funciókat látnak el és ezek a különbségek a PA-ok szerepében fajok között is eltérőek lehetnek, sőt fajon belül még az egyes szervekben is nagy eltérések lehetnek (Roychoudhury és mtsai., 2011).

Alet és mtsai. (2012) hosszútávú sóstressznek tette ki *A. thaliana* sóhiperszenzitív (Salt Overlay Sensitive, SOS), és PA bioszintézis mutánsokat, és megfigyelte a hosszútávú akklimatizációjukat. Kimutatták, hogy a nem letális, hosszú távú sóstressz Spd és Spm keletkezését indukálta, függetlenül SOS útvonaltól (Mahajan és mtsai., 2008), és a hiperszenzitív genotípus metabolikus válaszána erősebb indukcióját igényli.

Míg PA bioszintézis válasz sóra SOS útvonaltól függetlennek tűnik, addig *sos3-1* és *sos2-1* mutánsok kontroll körülmények között a magasabb PA-ok alacsonyabb szintjeit mutatták jelentős fenotípus eltérés nélkül. A CBL-függő protein kináz AtSOS2 és a Ca^{2+} szenzor AtSOS3 pozitívan befolyásolta PA bioszintézist. Azonban poszttranszlációs módosításokat feltételeznek, mert kontroll körülmények között tesztelt PA metabolikus gének nem expresszáldtak eltérő módon a vadtypushoz képest *sos3-1* növényekben. Az AtSOS2 és AtSOS3 más módon is befolyásolhatja a PA metabolizmust, ami hatással

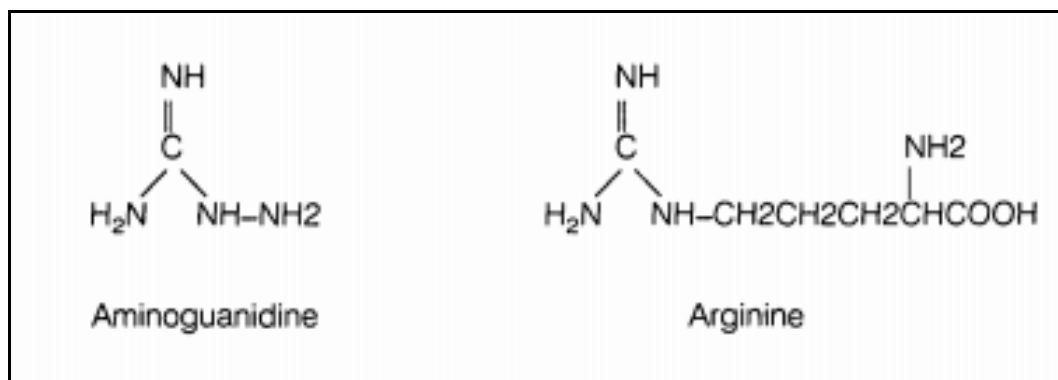
van a szabad PA-ok össztartalmára, mint a vakuoláris kompartmentalizáció, és apoplasztikus exkrécio (Bagui és Pistocchi, 1991).

A növényi szövetekben jelen levő ABA szintje megemelkedik só-és szárazságstressz hatására. Az is ismert, hogy ABA kiváltja a különböző, stresszadaptív gének expresszióját is (Mukherjee és mtsai., 2006). Exogén úton hozzáadott ABA befolyásolta a PA bioszintézis metabolikus enzimeit (ADC2, SPDS, és SPMS) sóstressz alatt (Alcázar és mtsai., 2006).

1.6. Az aminoguanidin, mint DAO gátlószer (?)

Az AG hatással van több enzimrendszerre, így gátolja AGE (Advanced Glycation End Products), az előrehaladott nem enzimatisz glikációs végtermékek képződését. Ezen kívül kimutatták, hogy már nM-os koncentrációban képes gátolni a DAO enzimet, melyet munkánk során is vizsgáltunk. Az AG felépítése hasonlít az L-arginin szerkezetéhez, így 2 kémiaiag egyforma amino-csoportot tartalmaz (Griffiths és mtsai., 1993).

Az AG specifikus iNOS (indukálható nitrogén-oxid-szintáz) gátlószerként is ismert, AG antioxidánsként és szabadgyökfogóként hat. Védelmet nyújt az oxidatív stressz és NO-termelődés ellen. Így az eredmény csökkent ROS és NO termelődés (Di Paola és mtsai., 2004). Az AG-nek gyökfogó hatása van ONOO⁻, [•]OH, H₂O₂-vel szemben, valamint gátolja a lipidperoxidációt is (Mansour és mtsai., 2002). Laszló és mtsai (1995) AG-t 5 mM-os koncentrációban alkalmazta, mely irreverzibilisen gátolta mind a konstitutív, mind az indukálható NOS aktivitását állati sejtekben. Corpas és mtsai (2006) borsóval végzett kísérletében 5 mM-os AG-t használva 95- 100 %-os gátlást váltott ki hajtásban és gyökérben egyaránt. Az AG a NO festési eljárásoknál rutinszerűen alkalmazott negatív kontroll előállítására (Sandalio és mtsai., 2008).



3. ábra: Az aminoguanidin és az L-arginin szerkezetének összehasonlítása (Griffiths és mtsai., 1993.)

1.7. A NADPH-oxidáz, és a difenilén-jodónium (DPI)

NADPH-oxidáz (NOX) a reaktív oxigénformák képződésének egyik fő forrása. Szuperoxid gyökkanion (O_2^-) képződését katalizálja, ami a biológiai folyamatok széles körét regulálja. NOX a plazmamembránon elhelyezkedő enzim, mely NADPH-t használ elektron donorként apoplasztikus O_2^- képződésére. A NADPH-oxidáz széles körben megtalálható a gerinctelenekben, gerincesekben, gombákban, és a magasabb rendű növényekben. A növényekben a NADPH oxidázok az Rboh-k (Respiratory burst oxidase homolog), és multigén családot alkotnak. Növényekben eddig számos Rboh gént fedeztek fel, összesen 27-et, ebből 19-et kétszikűekben, 5-öt egyszikűekben, 3-at alacsonyabb rendű növényekben.

Iannone és mtsai. NADPH- oxidáz-like enzimet gátolták 2013-as cikkükben az összes PA-nál, de a H_2O_2 szintje mégis időtől-és koncentrációtól függően megnőtt, melyet valószínűleg más ROS-generáló enzimek generáltak. Az első számú jelölt a PAO (Spd, Spm), de emellett más enzimek működése során is felszabadul H_2O_2 .

Az emlős NADPH-oxidáznak membrán-kötött és citoszólikus fehérjekomponensei vannak. A komplex közepén egy heterodimer NADPH-kötő flavocitokróm b558 fekszik, amely 2 glikozilált gp91phox és nem glikozilált p22phox fehérje alegységből épül fel. Aktiváció során a citoszólikus p47phox és p67phox fehérjék foszforilálódnak, és transzlokálódnak p40phox-szal és p21raccal együtt a membrán komponensekhez, és az aktív NADPH-oxidáz összeáll (Segal és Abo, 1993). A növényekben a gp91phox homológ hiányos géneknek hasonló válaszai voltak stresszhatásra, és kevésbé voltak képesek ROS-t akkumulálni. Antiszensz paradicsom vonalak redukált ROS akkumulációt mutattak és kivédtek a sebzés által okozott stresszt (Sagi és mtsai., 2004).

Arabidopsis növények gp91phox hiányos gének homológjai, a AtrbohD és AtrbohF csökkentette a ROS akkumulációt, és az avirulens *Pseudomonas syringae* baktériumos kezelésre sejthalálhoz vezetett (Torres és mtsai., 2005), valamint ABA kezelésre csökkent a sztómazáródás (Kwak és mtsai, 2003). Ezek az adatok arra következtetnek, hogy a növényi NADPH-oxidáz homológ gének fontosak a növényi ROS akkumulálásában.

Másik ROS-forrás a mitokondriumban az elektrontranszportlánc. Diszfunkciója során a O_2^- keletkezik. Ennek kivédésére a mitokondrium egy másik védelmi vonalat működtet, ami egy alternatív terminális oxidázon alapul (AOX). AOX megvédi a mitokondriális elektrontranszportot az elektron túltöltődéstől (Atkin és mtsai., 2002).

Efthimios és mtsai. kísérletében (2014) az exogén PA kezelés növelte az oxigénfogyasztást *Arabidopsis*-ban, NADPH-oxidáz-függő módon. A peroxiszómális AtPAO3-at overexpresszáló *Arabidopsis* csökkentett oxigénfogyasztási rátát eredményezett, szöges ellentétben a funkcióvesztéses *Atpao3* növényekkel, melyek megnövekedett oxigén-fogyasztási rátát mutattak, AOX-rendszeren keresztül. Ebben a tekintetben AtPAO3 overexpresszáló növényekben a O_2^-/H_2O_2 egyensúlyban termelődött, míg a funkcióvesztéses mutánsban magas O_2^-/H_2O_2 arány mutatkozott. A növekedés gátlható volt DPI-vel (difenilén-jodónium), de aszkorbáttal nem. DPI egy lipofil reagens, amely eredményes NADPH-oxidáz által előállított O_2^- gátlószer. A NADPH-oxidáz plazmamembrán kötött, elektrondonorként NADPH-t használ (Doussiére és Pierre, 1992).

DPI a NADPH-oxidáz gátlása mellett oxidatív stresszt idézhet elő, például egér N11 gliális sejtekben megemelte a H_2O_2 szintjét. Emellett lipidperoxidációt is megfigyeltek, DPI megváltoztatta a sejtszintű redox egyensúlyt azáltal, hogy csökkentette a redukált glutation szintjét, az oxidáltat pedig megnövelte. (Riganti és mtsai, 2004). Másrésről a DPI NADPH-oxidáz mellett más, flavintartalmú enzimeket is gátol, mint a NOS, vagy a PAO (Stuehr és mtsai., 1991).

2. Célkitűzések

Kísérleteinkben célul tűztük ki a poliamin katabolizmus tanulmányozását eltérő koncentrációjú, rövidtávú NaCl kezelésnek kitett paradicsom növényekben az idő függvényében. Annak kiderítésére, hogy a poliamin katabolizmus melléktermékeként megjelenő hidrogén-peroxid milyen jelentőségű a sóstressz alatt kísérleteinket két, eltérő módon ható gátlószer segítségével végeztük el. Az aminoguanidint (AG) specifikus diamin-oxidáz gátlószerként használtuk, míg a difenilén-jodónium (DPI) a NADPH-oxidáz enzim gátlószere, ami indirekt módon befolyásolhatja a hidrogén-peroxid szinteket.

Kérdéseink a következők voltak:

- A szubletális, 100 mM NaCl és a letális, 250 mM NaCl kezelés hogyan hat a paradicsom növények PA lebontó enzimek aktivitásaira (DAO, PAO), a melléktermékként is megjelenő H_2O_2 tartalomra paradicsom hajtásban és gyökérben az idő függvényében?
- A rövidtávú sókezelés alatt hogyan változik a hajtás szövetek szabad poliamin spektruma az idő függvényében?
- Az AG és DPI kezelés hatására 0,5 és 2 óra után milyen változások mutathatóak ki a PA lebontó enzimek aktivitásaiban (DAO, PAO), valamint a H_2O_2 tartalomban paradicsom hajtásban és gyökérben?
- Az AG kezelés szelektíven gátolja-e a DAO enzimet? Milyen hatással van az AG kezelés a gyökércsúcsok NO tartalmára? Látható-e hasonló változás a DPI-kezelt minták esetén?
- A szabad poliamin spektrum hogyan változik a két gátlószer hatására sóstressz alatt a paradicsom növények hajtásaiban 0,5 és 2 óra kezelés esetén?
- A gyökércsúcsok összes ROS tartalma, szuperoxid gyökanion szintje és a nitrogén-oxid szintje hogyan alakul 0,5 és 2 órás kezelések esetén?

Összefoglalva, a legfontosabb kérdésünk az volt, hogymilyen változások következnek be a poliamin katabolizmusban rövidtávú sóstressz alatt, ha az egyik fontos elemének, a hidrogén-peroxidnak a mennyiségét két eltérő úton, két különböző mechanizmussal ható gátlószer segítségével módosítjuk.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgált növények nevelési paramétere

3.1.1. Növények nevelési paramétere, alkalmazott kezelések

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* L. cvar Rio Fuego paradicsom növényeket vizsgáltunk. A magokat három napig, sötétben csíráztattuk 26 °C-on. Csírázás után a növények kéthetes korukig perlitben növekedtek, majd hidropónikus körülmények között, módosított Hoagland tápoldatban fejlődtek hathetes korukig. A tápoldatot hetente kétszer cseréltük. A növények a következő nevelési paraméterek mellett fejlődtek: 12 órás nappali, 12 órás éjszakai periódus, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 55-60 %-os relatív páratartalom.

A sókezelést (NaCl) a növények 6 hetes korában alkalmaztuk 100 mM-os és 250 mM koncentrációban. A gátlók alkalmazása szintén 6 hetes korban történt. Az AG kezelést 1 mM-os koncentrációban adtuk a tápoldathoz, míg a DPI gátlószert 10 μM -os koncentrációban alkalmaztuk.

A mintavételi időpontok a kezelés után 0, 0,5, 1, 2 3 órával voltak. A gátlószerekkel végzett kísérletek a kezelés kezdete utáni 0,5 és 2 órára terjedtek ki. A gátlószereket a sókezelés előtt 10 perccel adtuk a tápoldathoz.

A mintavétel a 6 hetes növények csúcstól számított második levélemeletéből (n=3), valamint a gyökerekből (n=3) történt. A fluoreszcens festéseket paradicsom növények gyökércsúcsaiból végeztük (n=4-6).

3.2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

3.2.1. A DAO (EC 1.4.3.6) és PAO (EC. 1.5.3.14) katabolikus enzimek aktivitásának mérése

A DAO és PAO enzimek aktivitásait spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A módszer Δ^1 -pirrolin kolorimetriás meghatározásán alapszik. A DAO enzimaktivitás meghatározásához szubsztrátként putreszcint, a PAO enzimaktivitás méréséhez spermidint használtunk (Holmstead és mtsai, 1961). A növényi mintákat folyékony

nitrogénben porítottuk, majd extrakciós puffert mértünk rá. Az extrakciós puffer összetétele: 1 M Tris pH=8.0, 50 % glicerol, 20 % Triton-X 100, 100 mM PMSF, 1 mM leupeptin. Az extraktumot centrifugáltuk 12000 rpm-en 10 percig 4 °C-on. A felülúszóhoz foszfátpuffert és 1 M Put-t, ill. Spd-t adtunk, majd 37 °C-on 1,5 óráig inkubáltuk. Inkubáció után 20 %-os TCA-t és 10 mg/ml 2-amino-benzaldehidet adtunk. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 12000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A Δ^1 -pirrolin termék keletkezését 430 nm-en az abszorbancia leolvasásával detektáltuk (Moschu és mtsai, 2008).

3.2.2. H₂O₂ fotometriás meghatározása

A minták H₂O₂ tartalmát Velikova és mtsai (2000) alapján határoztuk meg spektrofotometriás módszerrel. A friss növényi szöveteket 0,1%-os TCA-val, hűtött dörzsmozsárban homogenizáltuk el, majd Eppendorf centrifugacsövekben 12000 rpm-en, 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz hozzáadtunk 10 mM-os, pH 7-es foszfát puffert, ami KH₂PO₄-et és K₂HPO₄-et tartalmaz, és 1 M KI-ot adtunk. 10 perces inkubáció után a minták fényelnyelését 390 nm hullámhosszon mértük. A kapott eredményeket $\mu\text{mol} / \text{g FT}$ -ben adtuk meg, ismert koncentrációjú H₂O₂ oldatokkal készített kalibrációs egyenes alapján számolva.

3.2.3. Szabad poliaminok analízise

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

3.2.4. Az életképesség meghatározása FDA segítségével

A paradicsom gyökércsúcsok életképességének meghatározásához 10 μ M fluoresceindiacetát (FDA, Sigma) festéket alkalmaztunk.

Paradicsom gyökércsúcsok esetében a festéket az egyes kezelések alkalmazása után adtuk a gyökerekhez, majd az 5 perces inkubáció után a felesleges festék eltávolítása érdekében 5 perces mosást alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyelést ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük el. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai, 2003). A felvételek készítésénél 5x-os objektívet alkalmaztunk. Az expozíciós idő mindig azonos, 773 ms volt. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR). A kiértékelés az AxioVision 4.5 nevű programmal történt.

3.2.5. NO meghatározás DAF-FM DA festékkel

A NO-t 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM DA) festékkel mutattuk ki. Diacetát formában ez a festék képes bejutni a sejtbe ezután az acetyl csoportokat intracelluláris észterázok hasítják, a keletkező molekula reagál a N_2O_2 -vel (ami egy NO termék) létrehozva egy fluoreszcens triazol molekulát (Kolbert és mtsai., 2011). A festés során a gyökereket 10 μ M-os DAF-FM DA festékkoldattal festettük 20 percig sötétben 10 mM MES-TRIS/KCL pufferben (pH 5.8) szobahőmérsékleten. Festés után egyszer mostuk a növényi mintákat 10 mM MES-TRIS/KCl pufferrel (pH 5.8) (Kolbert és mtsai, 2012) A mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk, fluoreszcens üzemmódban. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású, digitális kamera (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, a fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai., 2003.).

Az expozíciós idő mindig azonos volt, 2,4 s. A felvételek készítésekor ötszörös nagyítású objektívet alkalmaztunk. A gyökércsúcsokról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A NO zöld fluoreszcenciája alapján megmértük a

pixel intenzitást, ami a –NO tartalommal arányos. Az értékelés az Axiovision 4.6 nevű program segítségével történt.). A felvételek készítésekor 5x nagyítást alkalmaztunk.

3.2.6. Szuperoxid gyökanion detektálása

Az intracelluláris $O_2^{\cdot-}$ dihidroetidium (DHE) festéssel történt. A DHE képes a sejtfalon áthaladni és egy kételektronos oxidációs folyamat során DNS-kötő, fluorofór etidium bromiddá vagy ehhez szerkezetileg nagyon hasonló terméké alakulni (Benov és mtsai., 1998). Ez a folyamat relatív specifikus szuperoxid gyök anionokra, minimális oxidációt indukálhat a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hipoklórsav (HOCL) is (Benov és mtsai., 1998). A törzsoldat 5 mM-os DMSO oldat volt. 10 μ M DHE festék oldat 10 ml-re: 20 μ l törzsoldatból és 9980 μ l Tris pufferből állt. A Tris puffer: 10 mM-os Tris-HCl oldat volt, amelynek pH-ja 7,4 volt. A mintákat kisméretű műanyag Petri-csészékbe helyeztük és a DHE oldattal festettünk, 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a festett mintákat. Ezek után kétszer 15 percig mostunk Tris pufferrel. A mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk, fluoreszcens üzemmódban. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású, digitális kamera (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével. Az értékelés az Axiovision 4.6 nevű program segítségével történt.). A felvételek készítésekor 5x nagyítást alkalmaztunk.

3.2.7. Összes ROS vizsgálata

Az összes ROS *in situ* meghatározására pedig egy arra alkalmas fluoreszcens festéket, 2,7-dikloro-dihidrofluoreszcein-diacetátot (H_2DC -FDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használtunk. A H_2DC -FDA festés alkalmazása során a gyökereket 15 percen keresztül festettük 37 °C-on 10 μ M-os H_2DC -FDA alkalmazásával. Korábban kimutatták, hogy ez a festék alkalmas a H_2O_2 kimutatására, de inszenzitív nitrogén-oxidra (Myhre és mtsai., 2003.; Bi és mtsai., 2009.).

A festés után 20 percen belül négyszer mostuk a gyökércsúcsokat 2-(N-morfolin) etánszulfonsav (MES, Reanal, Budapest, Magyarország) pufferrel (10^{-3} M, pH 6,15), majd mikroszkópos tárgylemezre helyeztük őket. Az így előkészített mintákat ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A felvételek készítésénél 5x objektívet alkalmaztunk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású

digitális kamera segítségével (Axiocam HR, HQCCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A detektált fluoreszcencia intenzitást az Axiovision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg.

3.2.8. Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok 3-6 egymástól függetlenül készített ismétlés átlagai a standard hibával. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket Student-féle t-teszttel állapítottuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**) vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken SigmaPlot 11.0 nevű szoftver használatával.

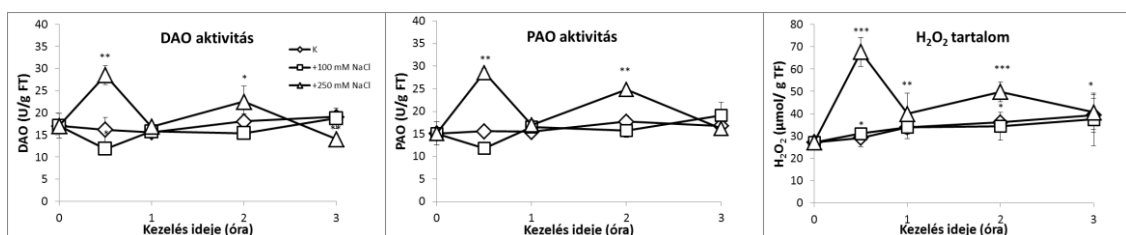
4. Eredmények és értékelésük

4.1. A rövidtávú sóstressz hatása a poliaminok lebontására

4.1.1. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H₂O₂ szint változása az idő függvényében paradicsom hajtásban

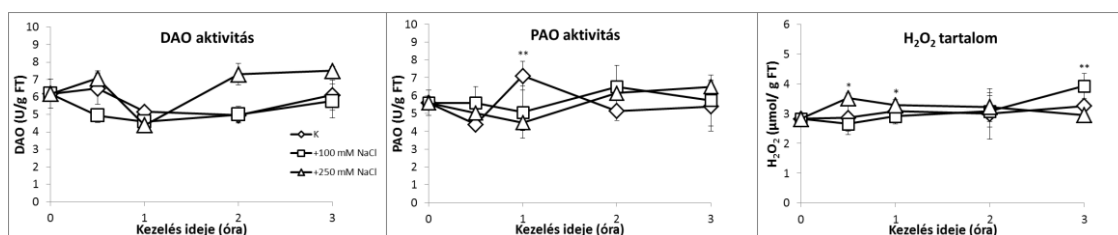
Elsőként a két eltérő NaCl koncentráció hatását vizsgáltuk meg idő függvényében a poliamin lebontó enzimek aktivitására és a reakciójuk melléktermékeként megjelenő H₂O₂ szintekre paradicsom hajtásokban.

A 100 mM NaCl kezelt növények DAO és PAO aktivitásai nem különböztek szignifikánsan a kontrollhoz képest, míg a letális koncentráció kettős csúcsot mutatott mind 3 vizsgált paraméterben, a kezelés 0,5 és 2 órájánál. Ez a tendencia összefügghet a poliaminok lebontásának napi ritmusával (3. ábra).



3. ábra: A 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatása a DAO, PAO enzimaktivitásokra és a H₂O₂ szintjére, idő függvényében paradicsom hajtásban. (Átlag±SD, n=3)

4.1.2. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H₂O₂ szint változása az idő függvényében paradicsom gyökérben

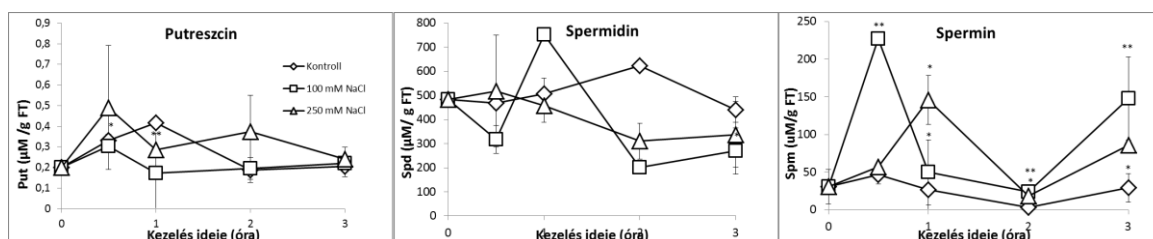


4. ábra: A 100 mM és 250 mM NaCl kezelés hatása a DAO, PAO enzimaktivitásokra és a H₂O₂ szintjére, idő függvényében paradicsom gyökérben. (Átlag±SD, n=3)

Gyökérben a DAO és PAO aktivitások lényegesen alacsonyabbak voltak a hajtáshoz viszonyítva, ez hozzájárulhatott az alacsonyabb H₂O₂ tartalomhoz. 250 mM NaCl kezelés hatására 2 és 3 óránál mind a DAO, mind a PAO aktivitása emelkedést mutatott a kontrollhoz képest (4. ábra).

4.1.3. A szabad poliamin szintek meghatározása sókezelt paradicsom hajtásokban az idő függvényében

A szabad poliaminok (Put, Spd, Spm) vizsgálatát HPLC segítségével határoztuk meg idő- és sókoncentráció függvényében. A Put, Spd, Spm eredmények az 5. ábrán láthatóak. 100 mM NaCl kezelt hajtások Put tartalma a kísérlet elején a kontroll hajtások értéke alatt maradt, ezzel egyidőben a magasabbrendű poliaminok (Spd, Spm) szintje megemelkedett. Ez a változás hozzájárulhat a későbbi sikeres sóstressz elleni védekezéshez. A letális sókoncentráció (250 mM) rövidtávon ugrásszerű Put emelkedést váltott ki, míg a Spd és Spm szintek esetében megfigyelhető volt a kettős csúcs 0,5 és 2 óránál nem volt jelentős eltérés a kontrollhoz képest (5. ábra).



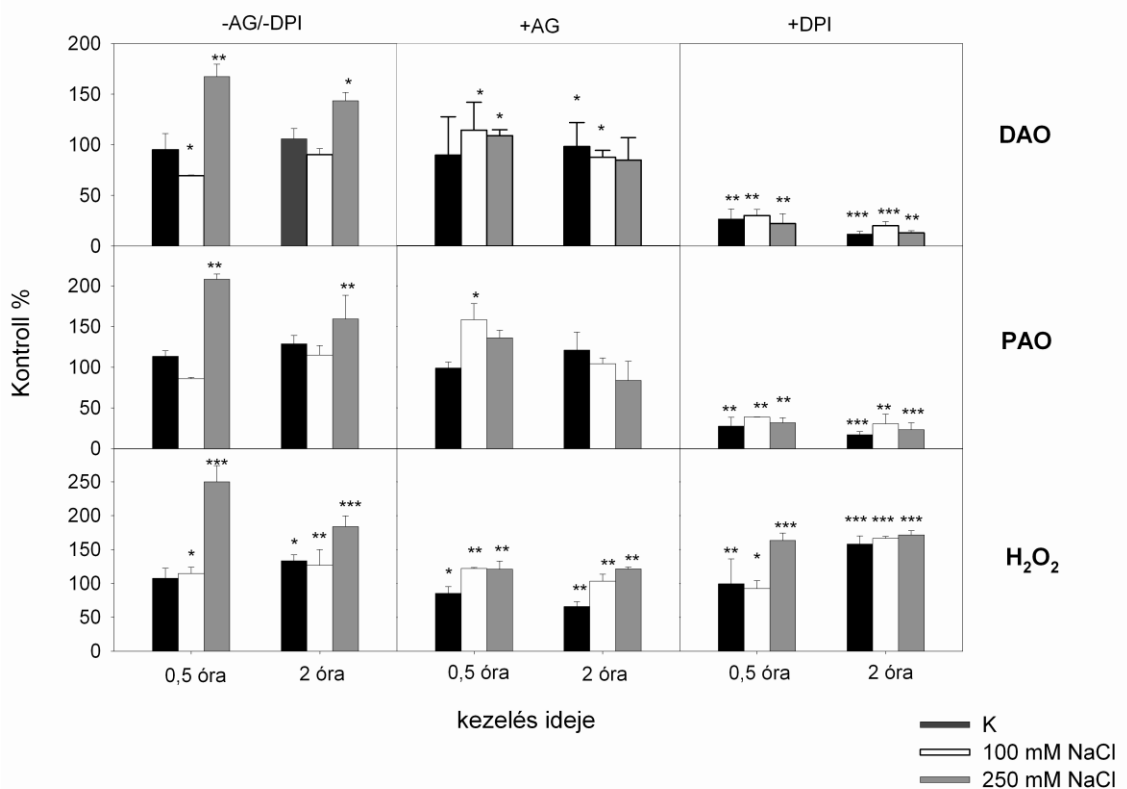
5. ábra: A Put, Spd, Spm szintje idő- és sókoncentráció függvényében 6 hetes paradicsom növények hajtásában. (Átlag $\pm$ SD, n=3).

4.2. Az aminoguanidin (AG) és difenilén-jodónium (DPI) gátlószerek hatása a paradicsom növények poliamin katabolizmusára rövidtávú sóstressz esetén

4.2.1. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H_2O_2 szint változása AG és DPI kezelt paradicsom hajtásokban

Ahogy az irodalomból már jól ismert, a letális sókoncentrációval történő kezelés jelentősen megemelte mindkét vizsgált időpontban a lebontó enzimek aktivitásait, valamint a melléktermékként megjelenő H_2O_2 tartalmakat. A 100 mM NaCl kezelt hajtások kismértékű enzimaktivitás csökkenéseket mutattak, míg a H_2O_2 nem változott a kontrollhoz viszonyítva jelentősen (6. ábra). Az AG esetében a DAO változása nem volt jelentős egyik sókoncentráció esetében sem, míg a PAO aktivitás 0,5 óránál enyhe emelkedést mutatott mindkét sókoncentráció esetén. A H_2O_2 szintek a 100 mM NaCl hatására nem mutattak változást AG kezelést követően, míg a kontroll, illetve a 250 mM NaCl kezelt hajtások H_2O_2 tartalmában csökkenés következett be. A DPI kezelés alatt a DAO és a PAO enzimek aktivitásai a kiindulási kontroll értékekhez viszonyítva

nagymértékű csökkenést mutattak, a H₂O₂ tartalmak esetében csak a 250 mM NaCl kezelt hajtások mutattak csökkenést 2 óránál (6. ábra). A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a NADPH-oxidáz gátló DPI nagymértékben hozzájárult a poliamin lebontó enzimek csökkent működéséhez.

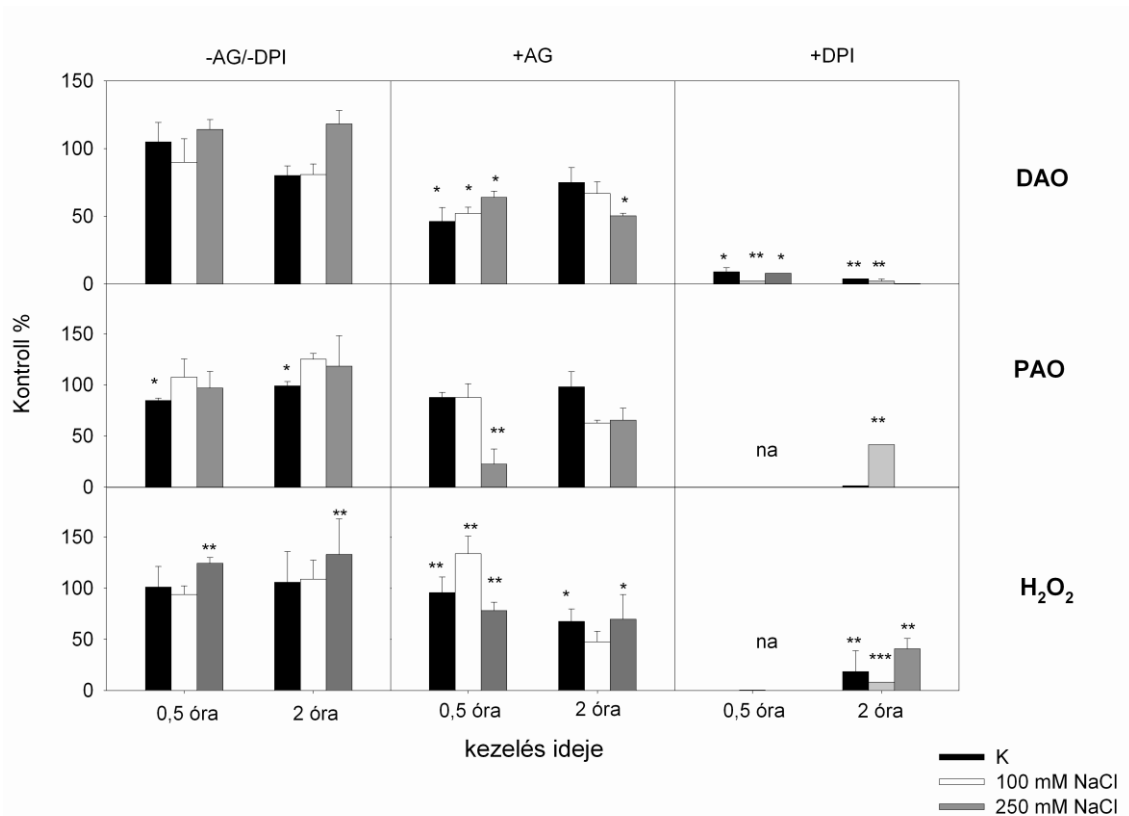


6. ábra: Az AG és DPI gátlószerek hatása H₂O₂ szintjére, 100 mM NaCl és 250 mM NaCl kezelés mellett paradicsom növényekben, idő függvényében hajtásban, K %-ban kifejezve a 0. órás méréshez viszonyítva. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól P<0,05 (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).

4.2.2. A poliamin lebontó enzimek, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) aktivitása és a H₂O₂ szint változása AG és DPI kezelt paradicsom gyökérben

Gyökérben kontroll körülmények között a 100 mM NaCl kezelés alacsonyabb DAO aktivitás mellett a kontrollhoz viszonyítva magasabb PAO aktivitásokat váltott ki, míg a 250 mM NaCl esetében csak a 2 óra DAO aktivitás emelkedett meg. A H₂O₂ tartalmak nem mutattak jelentős eltéréseket.

Az AG kezelés mindhárom paraméter csökkenését okozta a kezelés időpontjától függetlenül gyökérben. A DPI kezelés a paraméterek nagymértékű csökkenését váltotta ki (7. ábra).

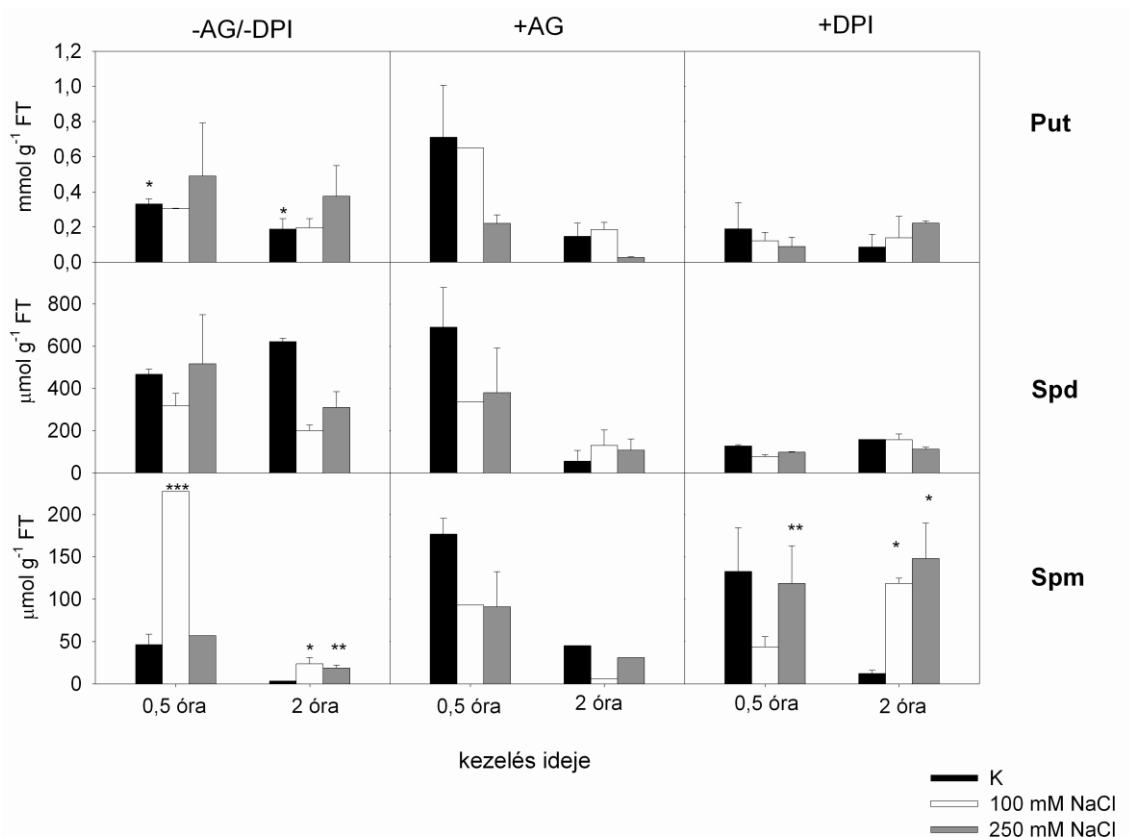


7. ábra: Az AG és DPI gátlószerek hatása H₂O₂ szintjére, 100 mM NaCl és 250 mM NaCl kezelés mellett paradicsom növényekben, idő függvényében gyökérben, K %-ban kifejezve, a 0. órás méréshez viszonyítva. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól P<0,05 (*), 0.01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, na= nincs adat)

4.2.3. A szabad poliamin szintek meghatározása sókezelt paradicsom hajtásokban AG és DPI kezelést követően

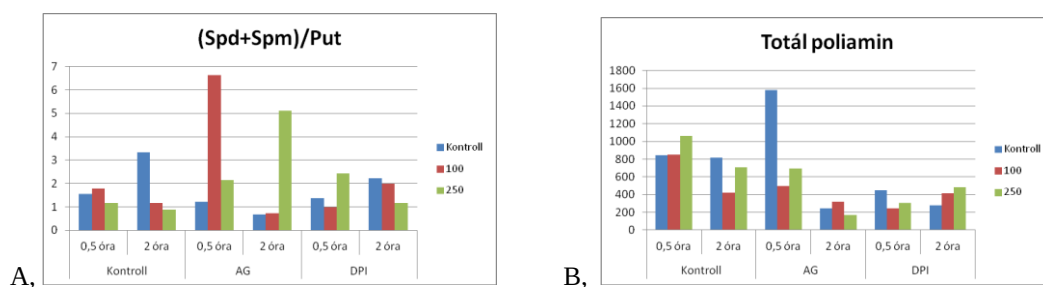
A poliamin eredmények kiértékelését a jelen dolgozatban csak a paradicsomhajtásokban végeztük el, mivel a gyökérben kapott eredményeink nagyon alacsony értékeket mutattak. A 100 mM NaCl kezelt növények túlélését nagyban növelheti a megemelkedett magasabbrendű poliaminok szintje (Spd, Spm), míg a letális sókoncentrációval történő kezelés csökkenéshez vezetett. Az AG kezelés esetén az irodalmi adatoknak megfelelően 0,5 óránál a DAO gátlásból adódóan bekövetkezett Put szint emelkedés mind a kontroll, mind a 100 mM NaCl kezelt növények esetében, míg a 250 mM NaCl kezelt hajtások esetében Put szint csökkenés történt. Ennek magyarázata

lehet a Spm szint emelkedése kontrollhoz viszonyítva. A DPI kezelés mind a Put mind a Spd szinteket jelentősen csökkentette a DPI nélküli kontrollokhoz képest, míg a Spm szintek mind a két időpontnál sókezelés hatására emelkedést mutattak, kivételt csak a 0,5 órás DPI-vel kezelt 100 mM NaCl kezelt hajtások Spm tartalma mutatott. (8. ábra).



8. ábra: A Put, Spd, Spm színje AG és DPI hatására kontroll és 100 mM NaCl és 250 M NaCl sókezelés mellett hajtásban. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól P<0,05 (*), 0.01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik)

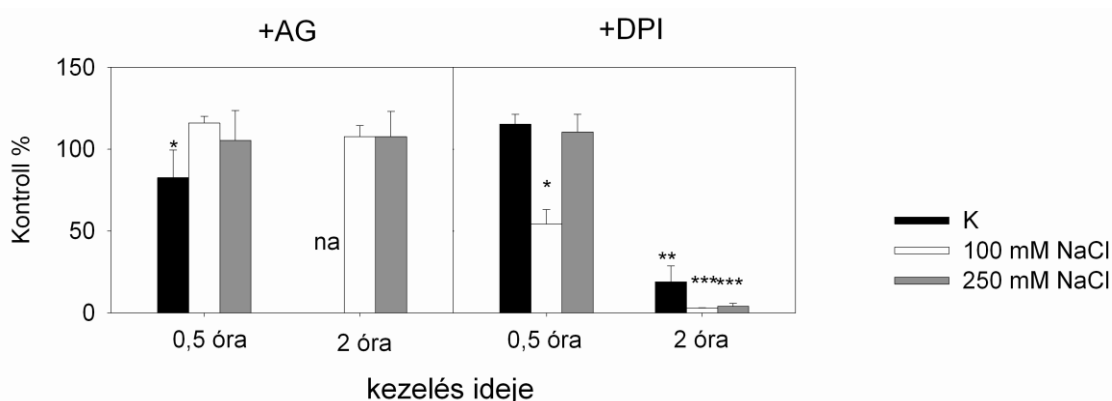
Az irodalomban a növények sótűrő képességének egyik paraméteréül használják a magasabbrendű poliaminok és a Put tartalom egymáshoz viszonyított arányát. Minél magasabb ez a szám, annál jobban képes elviselni a sóstressz hatásait. Az AG-val történő kezelések esetén ez az arány főleg 250 mM NaCl kezelt hajtások esetén mutatott jelentős emelkedést, bár az összes szabad poliamin szint csökkenést mutatott. A DPI kezelés mind kezelés időpontjától, mind a sókoncentrációtól függő változásokat mutatott a paraméterekben (9. ábra).



9. ábra: A (Spd+Spm)/Put aránya (A) és az összes (totál) szabad poliaminok szintje (B) kontroll, 100 és 250 mM NaCl kezelés hatására AG és DPI gátlószerek alkalmazása mellett paradicsom növényekben. (Átlag±SD, n=3)

4.2.4. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának életképességére

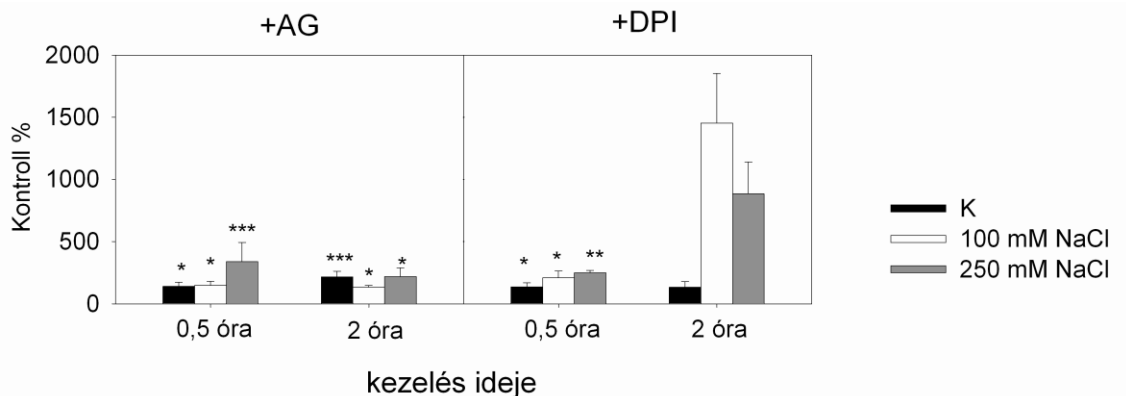
A stressz nélkül, kontroll körülményekben alkalmazott gátlószerek a gyökércsúcsok életképességének nagymértékű csökkenését váltották ki, míg a sókezelés mellett alkalmazott AG kismértékben növelte az életképességet, míg a DPI kezelés 2 óránál mutatott jelentős csökkenést (10. ábra).



10. ábra: AG és DPI hatása az életképességre 100 mM NaCl és 250 mM NaCl sókezelés mellett, paradicsom növények gyökércsúcsaiban. Az adatok K%-ban vannak ábrázolva. 5x nagyításon vizsgáltuk a kapott képeket (Átlag±SD, n=3-7, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól P<0,05 (*), 0.01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, na= nincs adat)

4.2.5. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának szuperoxid gyökéanion tartalmára

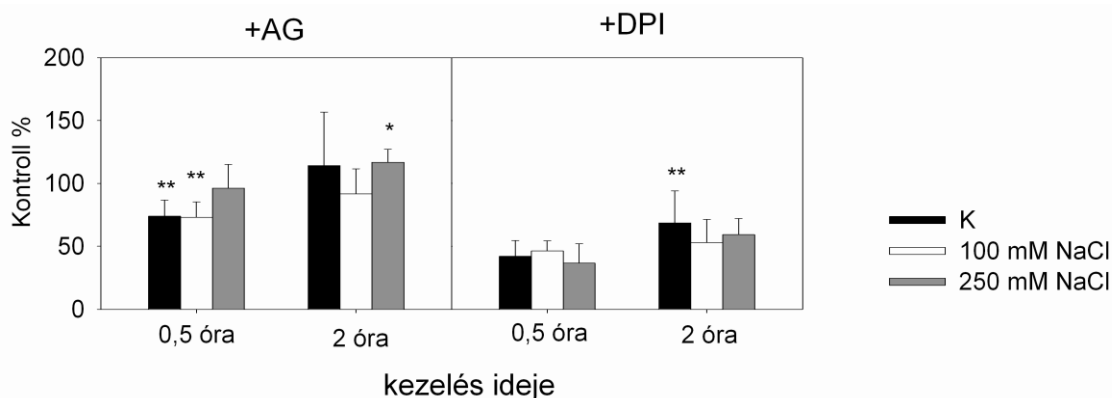
Mindkét gátlószer kiváltotta a szuperoxid gyökéanionok nagymértékű termelődését, és ahogyan az várható volt a DPI esetében főleg a 2 órás időpontban a sókezelés gyökércsúcsok mutatták a legnagyobb szuperoxid gyökéanion emelkedést (11. ábra).



11. ábra: AG és DPI kezelés hatása O_2^- tartalomra paradicsom gyökércsúcsban 100 mM NaCl és 250 mM NaCl sókezelés mellett. A pixel intenzitásokat a 0. idősz. kontrollhoz viszonyítottuk, majd ezt ábrázoltuk százalékos eltérésben. 5x nagyításon vizsgáltuk a kapott képeket. (Átlag $\pm$ SD, n=3-7, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól $P < 0,05$ (*), 0.01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).

4.2.6. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsainak NO tartalmára

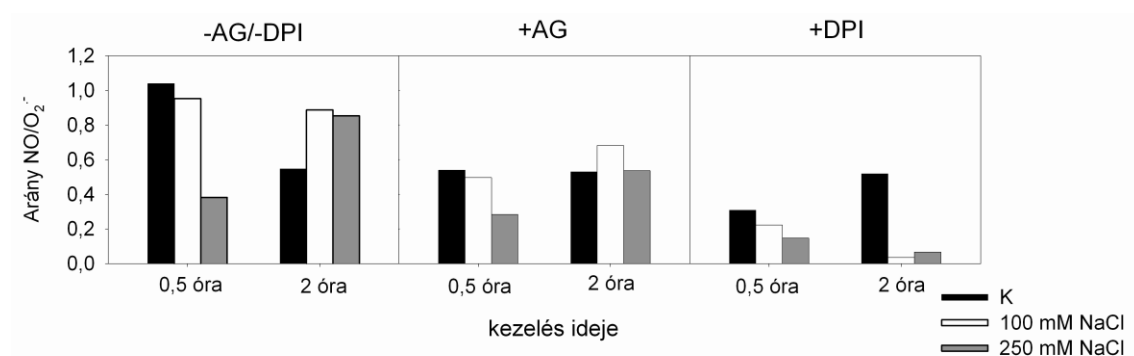
Az AG kismértékben lecsökkentette az NO értékeket, valószínűsíthető, hogy egy NO szintáz szerű enzimaktivitásra gyakorolt hatáson keresztül, míg a DPI kezelés meglepő módon minden esetben a NO tartalom csökkenését mutatta a kiindulási kontroll 0. idősz. eredményeihez képest (12. ábra). DPI NO csökkentő hatása feltételezhetően az enzimek FAD tartalmának gátlásán keresztül történhet meg.



12. ábra: AG és DPI kezelés hatása NO tartalomra gyökércsúcsban 100 mM NaCl és 250 mM NaCl sókezelés mellett. 5x nagyításon vizsgáltuk a kapott képeket. (Átlag $\pm$ SD, n=3-7, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól $P < 0,05$ (*), 0.01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).

Az NO és a szuperoxid gyökanionok aránya fontos információt ad arról, hogy a gyökércsúcsokban sejthalál következik be vagy pedig túlélnek. Amennyiben ez az arány csökken, akkor az a sejthalál irányába tolja el a paradicsom gyökércsúcsok állapotát. Ezért kísérleteinkben ezeket az arányokat is kiszámoltuk, és arra a következtetésre

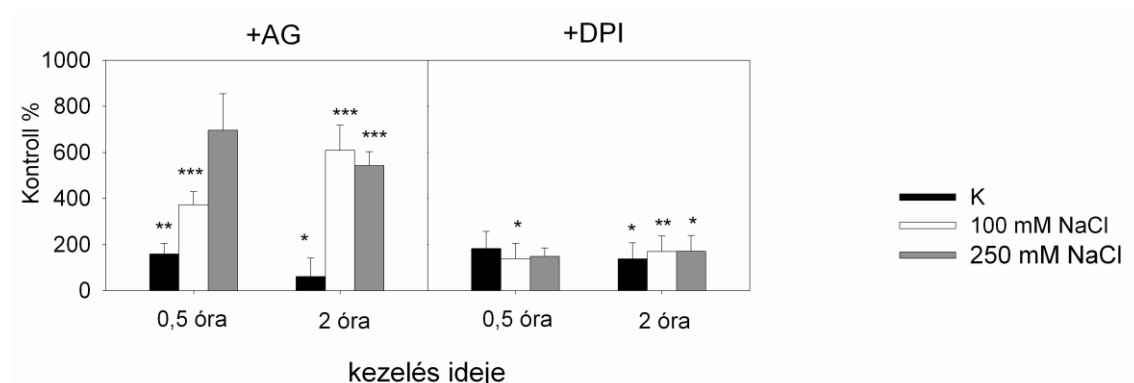
jutottunk, hogy idő függvényében eltérő változások következtek be, mind a kontroll, mind az AG kezelést követően. A DPI minden esetben a kontroll állapothoz képest egyértelmű csökkenést okozott ebben a paraméterben, köszönhetően a nagymértékű szuperoxid gyökánonion produkciónak sókezelést követően (13. ábra).



13. ábra: AG és DPI kezelés hatása a NO/szuperoxid gyökánonion arányra paradicsom gyökércsúcsban 100 mM NaCl és 250 mM NaCl sókezelés mellett.

4.2.7. Az AG és DPI hatása NaCl-kezelt paradicsom növények gyökércsúcsának összes ROS tartalmára

Az összes ROS tartalom esetén az AG kezelés a sókezelt paradicsom gyökércsúcsokban mindkét koncentrációnál kiugróan magas értékeket mutatott, míg a DPI kezelésnél nem tapasztaltunk ilyen jellegű változásokat, a DPI kezelt kontrollhoz viszonyítva nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. A fluoreszcens festék irodalmi adatok alapján képes nemcsak a szuperoxid gyökánonion és a H₂O₂, de a peroxinitrit kimutatására is. Az AG kezelés esetében feltételezhető, hogy a NO tartalom egy része peroxinitrit formájában jelent meg ezekben a gyökércsúcsokban (14. ábra).



14. ábra: AG és DPI kezelés hatása összes ROS tartalomra gyökércsúcsban 100 mM NaCl és 250 mM NaCl sókezelés mellett. 5x nagyításnál vizsgáltuk a kapott képeket. (Átlag±SD, n=3-7, a *-gal jelölt kezelt minta a 0. órás kontrolltól P<0,05 (*), 0.01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).

5. Összefoglalás

Kísérleteinkben célul tűztük ki a poliamin katabolizmus tanulmányozását eltérő koncentrációjú, rövidtávú NaCl kezelésnek kitett paradicsom növényekben az idő függvényében. A kísérleteinket két, eltérő módon ható gátlószer segítségével végeztük el. Az aminoguanidint (AG) specifikus diamin-oxidáz gátlószerként használtuk, míg a difenilén-jodónium (DPI) a NADPH-oxidáz enzim gátlószere, ami indirekt módon befolyásolhatja a hidrogén-peroxid szinteket.

A gátlószer nélkül végzett kísérleteinkben idő függvényében a 100 mM NaCl nem okozta a poliamin lebontó enzimek jelentős változását, míg a 250 mM NaCl 0,5 és 2 óránál mindhárom vizsgált paraméterben (DAO, PAO, H_2O_2) kettős csúcsot mutatott, mind hajtásban, mind gyökérben.

A szubletális 100 mM NaCl kezelt hajtások szabad poliamin tartalmaiban eltolódás történt a magasabbrendű poliaminok irányába, míg a letális sókoncentrációnál ez nem következett be, ezzel részben magyarázható ennek a koncentrációnak a letális hatása.

A gátlószerek alkalmazása esetében mind a lebontó enzimek (DAO, PAO) aktivitásaiban, mind a H_2O_2 tartalomban növényi szerv-, idő-, sókoncentráció függő eltéréseket tapasztaltunk, jelentősebb csökkenés a DPI kezelés hatására történt.

Az AG kezelés nem csak a DAO enzimaktivitásokat gátolta idő függvényében, hanem a PAO enzimek aktivitásaiban változások következtek be. A DPI kezelt minták jelentős csökkenését okozták a lebontó enzimek aktivitásainak. Megállapítható tehát, hogy a NADPH-oxidáz specifikus gátlószereként alkalmazott DPI nem ismert mechanizmuson keresztül képes a poliaminok lebontását nagymértékben csökkenteni. Ennek magyarázatára további vizsgálatok szükségesek, hogy kiderítsük, hogy ez a csökkenés a csökkent poliamin bioszintézissel összefüggésben áll-e.

Az AG kezelt növények hajtásaiban a Put szint emelkedés, ami a DAO gátlásból várható volt, csak a kontrollok esetén volt megfigyelhető, míg a sókezelés alatt a csökkent Put szint a magasabbrendű poliaminok bioszintézisére fordíthatott, amit az általunk kimért adatok is bizonyítanak. A DPI kezelés egyedül a Spm szintek emelkedésében játszott szerepet a sókezelések alatt, ami segítheti a növények sóstressz elleni védekezését.

A gyökércsúcsok életképességének vizsgálatakor kimutattuk, hogy stressz hiányában nagyobb életképesség csökkenés következett be a gátlók alkalmazásakor, mint a sóstressz esetén.

A gyökércsúcsok NO és a szuperoxid gyökanion tartalmát megvizsgálva megállapítható, hogy a rövidtávú DPI kezelés során bekövetkező robbanásszerű szuperoxid gyökanion produkció a sókezelt gyökércsúcsokban eltolta a NO és a szuperoxid gyökanion arányát a sejthalál irányába, ennek a háttere még tisztázásra vár.

A gyökércsúcsok összes ROS tartalmának vizsgálata során az AG kezelés jelentős emelkedéseket váltott ki a kontroll, illetve a sókezelt gyökércsúcsokban, feltételezhetően a megjelenő peroxinitrit felhalmozódásából adódóan.

Munkám során arra a következtetésre jutottam, hogy a specifikus DAO gátlószerként alkalmazott AG, valamint a NADPH-oxidáz specifikus gátlók szerként ismert DPI, időtől, az alkalmazott sókoncentrációtól, valamint növényi szervtől függő változásokat eredményezett a poliaminok lebontásában paradicsom növényekben