

# **A nitrogén-monoxid szignál jelenléte mezofillumban vashiány, cink- és kadmiumstressz hatására**

36. OTDK Biológia Szekció

Biológia BSc, II. évfolyam

készítette:

**Csizmadia Zsombor**

témavezető:

Zelenyánszki Helga

kutatóasszisztens

és

Dr. habil. Solti Ádám

egyetemi docens

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2022.

# Tartalomjegyzék:

|         |                                                        |    |
|---------|--------------------------------------------------------|----|
| 1       | Rövidítésjegyzék .....                                 | 4  |
| 2       | Bevezető .....                                         | 6  |
| 2.1     | Nitrogén-monoxid .....                                 | 6  |
| 2.1.1   | Termelődése, lokalizációja citoplazmában.....          | 6  |
| 2.1.1.1 | Reduktív útvonal .....                                 | 6  |
| 2.1.1.2 | Oxidatív útvonal .....                                 | 7  |
| 2.1.1.3 | NO-termelés a kloroplasztiszban.....                   | 8  |
| 2.1.2   | Szállítása, bomlása .....                              | 8  |
| 2.1.3   | Tirozin-nitráció.....                                  | 8  |
| 2.1.4   | A NO detektálása gyökfogó festékkel .....              | 9  |
| 2.2     | Nehézfémek.....                                        | 10 |
| 2.2.1   | Vashiány .....                                         | 10 |
| 2.2.2   | Cink-stressz .....                                     | 11 |
| 2.2.3   | Kadmium-stressz .....                                  | 13 |
| 3       | Célkitűzések .....                                     | 15 |
| 4       | Anyagok és Módszerek .....                             | 15 |
| 4.1     | Növénynevelés .....                                    | 15 |
| 4.2     | Kloroplasztisz izolálás.....                           | 16 |
| 4.3     | Protoplaszt izolálás.....                              | 16 |
| 4.3.1   | Protoplaszt izolálás Sigma enzimekkel .....            | 16 |
| 4.3.2   | Protoplaszt izolálás Serva enzimekkel .....            | 17 |
| 4.4     | DAF-FM DA festés .....                                 | 17 |
| 4.5     | Mikroszkópos technikák.....                            | 17 |
| 4.5.1   | Fluoreszcens mikroszkópia .....                        | 17 |
| 4.5.2   | Konfokális lézer-fluoreszcens mikroszkópia.....        | 18 |
| 4.6     | Poliakrialamid gélelektroforézis és western blott..... | 18 |
| 5       | Eredmények.....                                        | 19 |
| 6       | Diszkusszió.....                                       | 29 |

|    |                            |    |
|----|----------------------------|----|
| 7  | Összefoglalás.....         | 33 |
| 8  | Szerzői hozzájárulás ..... | 34 |
| 9  | Irodalomjegyzék.....       | 34 |
| 10 | Köszönetnyilvánítás .....  | 37 |

# 1 Rövidítésjegyzék

|                    |                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------|
| APX                | Aszkorbát-peroxidáz                                       |
| Arg                | L-Arginin                                                 |
| BSA                | <i>Bovin serum albumin</i>                                |
| DAF-2A DA          | 4,5-diaminofluoreszcein-diacetát                          |
| DAF-FM DA          | 4-amino-5-metillamino-2',7'-difluorofluoreszcein-diacetát |
| DNIC               | Dinitrozil-vas-komplex                                    |
| DTT                | Ditiotreitol                                              |
| EDTA               | Etilén-diamino-tetraecetsav                               |
| FIT                | <i>Fe-deficiency Induced Transcription Factor</i>         |
| FRO2               | <i>Ferric Reductase Oxodase</i>                           |
| GSH                | S-glutation                                               |
| GSNO               | S-nitrozoglutation                                        |
| GSNOR              | Nitrozoglutation-reduktáz                                 |
| GSONH <sub>2</sub> | Glutation-szulfonamid                                     |
| HEPES              | N-2-hidroxiletilpiperazin-N'-2-etánszulfonsav             |
| IRT1               | <i>Iron-Responsive Transporter1</i>                       |
| L-NAME             | NG-nitro-L-arginin-metilészter                            |
| MES                | 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav                            |
| NADH               | Nikotinamid-adenin-dinukleotid                            |

|                              |                          |
|------------------------------|--------------------------|
| NiNOR                        | Nitrit-oxidoreduktáz     |
| NO                           | Nitrogén-monoxid         |
| NO <sup>-</sup>              | Nitroxil-anion           |
| NO <sup>•</sup>              | Nitrogén-monoxid-gyök    |
| NO <sup>+</sup>              | Nitrozónium-kation       |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Nitrit-ion               |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Nitrát-ion               |
| NOS                          | Nitrogén-monoxid-szintáz |
| NR                           | Nitrát-reduktáz          |
| O.E.                         | Túlexpresszálló vonal    |
| PVP                          | Polivinil-pirrolidin     |
| SNO                          | S-nitrozotiol            |
| XOR                          | Xantin-oxidoreduktáz     |

## 2 Bevezető

A növényi szervezetekben a megváltozott biotikus vagy abiotikus hatásokra kialakuló fiziológiai állapotot nevezzük stressznek. A stresszt egy stresszor váltja ki, amely lehet valamilyen patogén vagy jelen esetben nehézfém. Az iparosodás és a fokozódó talajszennyezés következtében, a növényekben a nehézfémek felszívódhatnak, esetleg akkumulálódhatnak. A táplálékkal bevitt nagy mennyiségű nehézfém súlyos problémákat okozhat az emberi szervezetben, ezért is lehet fontos, hogy a nehézfémstresszre adott fiziológiai válaszokat megértsük és szignalizációjukat feltárjuk. Mint a legtöbb stresszre, a nehézfémstresszre is fokozott nitrogén-monoxid (NO) termelődés indul meg, tehát a NO szignalizációjának a vizsgálata segíthet a nehézfémstressz-válaszok megértésében. A dolgozatban a vashiány, a kadmium- és cink stressz hatására bekövetkező NO termelődés jellegét vizsgáltuk cukorrépa hajtásban.

### 2.1 Nitrogén-monoxid

#### 2.1.1 Termelődése, lokalizációja citoplazmában

A NO biológiai keletkezését két csoportba sorolhatjuk. A NO keletkezhet más vegyületek oxidálásával, ez az oxidatív útvonal, vagy keletkezhet redukálás révén, ez a redukzív útvonal.

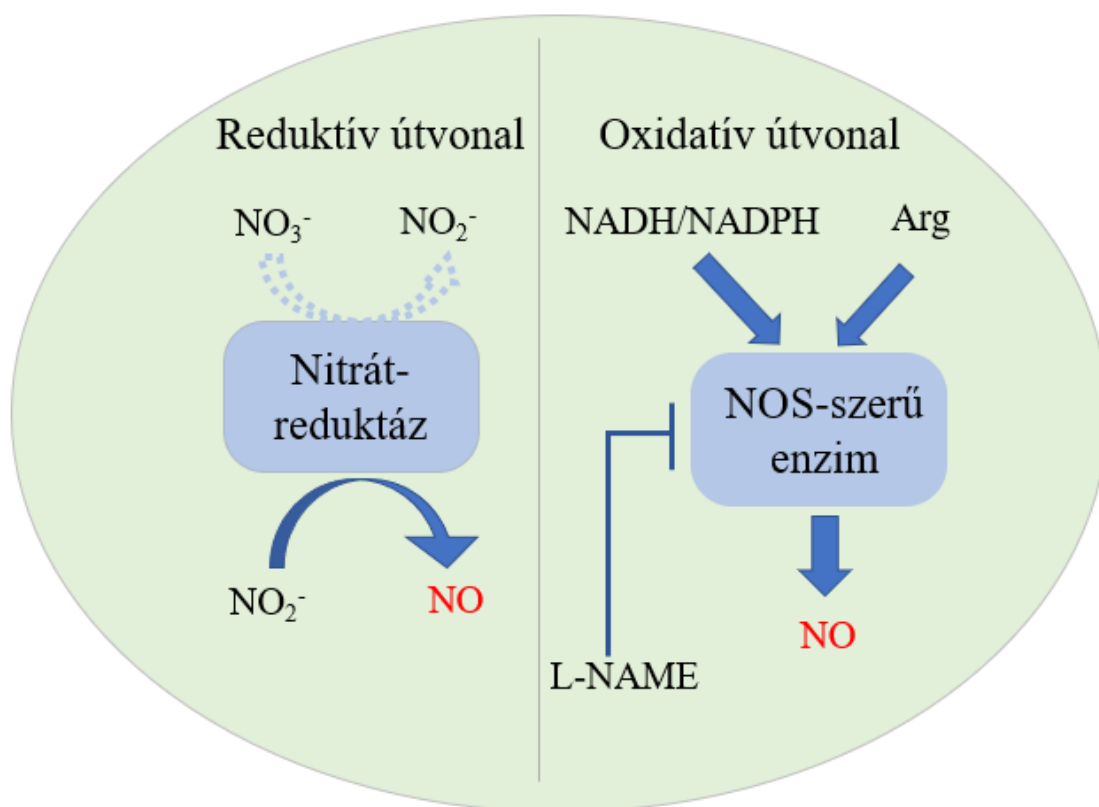
##### 2.1.1.1 Reduktív útvonal

A nitrát-reduktáz (NR) nagy affinitással köti a nitrátot és nitritet képez, azonban kis affinitással köti a nitritet és NO-t képez. Hipoxia esetén megnő a nitrit koncentrációja, ezért hatékonyan működik az NR általi NO termelés, viszont magas nitrát-szint esetén a nitrit verseng a katalitikus helyen a nitráttal, ezért ebben az esetben alacsony az NR NO termelése. A gyökérben található NR által generált nitritet alakítja nitrogén-monoxiddá a plazmamembránhoz kötött NiNOR. A redukzív úthoz tartozik a mitokondriumok által termelt NO, amelyet szintén nitritből állít elő a növényi szervezet. A redukáló erő ebben az esetben a mitokondriális elektrontranszportláncból származik. A peroxisómában található redox-szabályozású xantin-oxidoreduktáznak (XOR) kétféle izoformája van, melyek dehidrogenáz-, illetve oxidáz-aktivitással rendelkeznek. Anaerob körülmények között a xantin-oxidáz

izofomra képes nitrit redukálásával NO-t képezni, NADH vagy xantin segítségével (Gupta és mtsai. 2011., Kolbert és mtsai. 2019.)

### 2.1.1.2 Oxidatív útvonal

A NO termelés oxidatív útját valósítja meg a nitrogén-monoxid-szintáz szerű (NOS-like) enzim, amelynek működése során L-arginin (Arg) a szubsztrát, az elektrondonor pedig a NADH/NADPH. Szárazföldi növényekben még nem találtak az állati sejtekben megtalálható NOS-jellegű enzimet, de feltehetően növényi szervezetekben is van hasonló működésű enzim, ugyanis ez utóbbiak a NO Arg-ból történő termelését az állati sejtekéhez hasonlóan az L-NAME inhibitor blokkolja. NO poliaminokból és hidroxilaminokból is keletkezhet, azonban a pontos reakció és annak lokalizációja nem ismert. (Gupta és mtsai. 2011., Kolbert és mtsai. 2019.)



1. ábra Főbb NO termelődési útvonalak a növényi sejtekben. A reduktív útvonalhoz tartozik a nitrát-reduktáz, amely alapesetben nitrátot ( $\text{NO}_3^-$ ) redukál nitritté ( $\text{NO}_2^-$ ), azonban nitritből képes nitrogén-monoxidot (NO) is termelni. Az oxidatív útvonalhoz tartozik a NOS-szerű enzim, mely argininből (Arg) és NADH/NADPH-ból állít elő NO-t. Ezt az enzimet az L-NAME inhibitor gátolja. Forrás: saját ábra

### 2.1.1.3 NO-termelés a kloroplasztiszban

A kloroplasztiszokban NO termelődik, azonban a NO-termelés lokalizációjáról és enzimeiről keveset tudunk. A korábban említett NOS-szerű enzim és a nitrát-reduktáz lehet a legfontosabb NO termelődési folyamat a kloroplasztiszokban (Jasid és mtsai. 2006). Későbbi kutatások alapján egy NOS-szerű enzim lehet a domináns a NO termelésben, ugyanis NR gátlószer hatására nem változott a NO jel repce (*Brassica napus*) növényekben (Tewari és mtsai. 2013). A NO termelés egy másik lehetséges módja a fény-mediált nitrogén-dioxid (NO<sub>2</sub>) karotinoidok általi redukciója (Cooney és mtsai. 1994).

### 2.1.2 Szállítása, bomlása

A nitrozoglutation-reduktáznak (GSNOR) a NO-homeosztázis szabályzásban van kulcsfontosságú szerepe az eddigi tanulmányok alapján. A GSNOR egy NADH-függő enzim, az S-nitrozoglutation (GSNO) bontásában vesz részt. A nitrozoglutation NO és S-glutation reakciójával keletkezik. Az enzimreakció során alacsony glutation- (GSH-) szint esetén glutation-szulfonamid keletkezik, mely hidrolizál GSH-szulfinsavra és ammóniára. Magas GSH-szint esetén a GSNOH<sub>2</sub> GSH-diszulfidra és hidroxilaminra bomlik (Jahnová és mtsai. 2019).

A NO szállítása az GSNO kívül a dinitrozil-vas-komplexek (DNIC) segítségével történhet. A nitrogén-monoxidnak három formája van az élő szervezetekben: nitroxil-anion (NO<sup>-</sup>), nitrogén-monoxid gyök (NO<sup>•</sup>) és nitrozónium-kation (NO<sup>+</sup>). Ezek nagy affinitással komplexálnak vasat, így kialakítva a vas-nitrozil-komplexeket. A DNIC egy Fe<sup>2+</sup>, egy NO és egy glutation vagy cisztein között kialakuló komplex. A glutationnal kialakított DNIC stabilabb, mint a ciszteinnel kialakított. A DNIC *in vitro* képes transznitrozilációra, így képes lehet metalloproteinekre NO csoportot adicionálni, ezáltal a NO-nak egy lehetséges szállítómolekulája a DNIC. (Graziano and Lamattina, 2005).

### 2.1.3 Tirozin-nitráció

A tirozin-nitrációhoz, a tirozin oxidációja tirozin-gyökké és nitrogén-dioxid-gyök (•NO<sub>2</sub>) szükséges. A folyamathoz, ellentétben a foszforilációval, nem kell enzimműködés. A tirozin aromás gyűrűinek oxidációját hidroxil-gyök (•OH) és karbonát-gyök (•CO<sub>3</sub>) érheti el. Peroxinitrit protonálódásával peroxo-nitritsav keletkezhet, amely hidroxil-gyökké és nitrogén-

dioxid gyökké bomlik. A másik lehetséges reakciónál a peroxinitrit a  $\text{CO}_2$ -vel reagálva nitrozo-peroxo-karboxilátot hoz létre, mely karbonát gyökké és  $\cdot\text{NO}_2$ -vé alakul. A harmadik úton a NO oxidálódik nitritté, amely a hidrogén-peroxiddal együtt bontódik hidroxil-gyökké és nitrogén-dioxid gyökké. Az előbbi három folyamatból keletkező hidroxil- vagy karbonát-gyök a tirozin oxidációjában vesz részt, a nitrogén-dioxid-gyök pedig a tirozin-nitrációban kerül felhasználásra. (Kolbert és mtsai. 2017.)

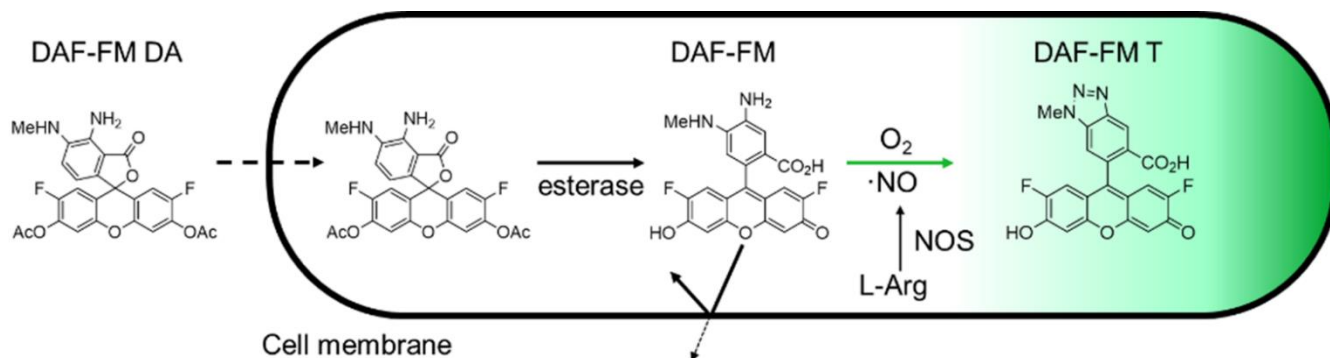
A nitráció jelenlegi tudásunk szerint irreverzibilis, mivel még nem találtak denitráz aktivitású enzimet a növényekben, szemben az állati szervezetekkel (Deeb és mtsai. 2013.), ezért az esetleges reverzibilitás kérdéses maradt. Jelenlegi tudásunk szerint a tirozin-nitráció irreverzibilis. (Corpas és mtsai. 2021.) A tirozin-nitrációt szenvedett fehérjék nagyobb eséllyel bontódnak le a proteoszómákban, mint más fehérjék és a tirozin-nitráció csak a teljes tirozin-mennyiség 1–2%-ra hathat, ezért feltételezhető egy erős szelektivitás (Kolbert és mtsai. 2017.).

A növényekben eddig összesen 100 olyan fehérjét találtak, melyek tirozin-nitrációra hajlamosak lehetnek, azonban az eddigi kutatások csak 13 fehérjét azonosítottak, amelyeknél ismerjük a poszt-transzlációs modifikáció hatását és funkcióját is. (Arasimowicz-Jelonek és mtsai. 2019.) Reaktív nitrogén gyökök (RNS) mennyiségének növekedésével, a tirozin-nitráció jelenléte szintén növekedik, tehát a tirozin-nitráció egy lehetséges RNS jelző lehet. Másrészt a tirozin-nitrációban részt vevő fehérjék nagy része kulcsfontosságú antioxidatív enzimek, amelyek aktivitását gátolja a tirozin-nitráció. Ilyen fehérjék a kataláz, aszkorbát-peroxidáz, monodehidro-aszkorbát-reduktáz és több szuperoxid-diszmutáz izoenzim is. Továbbá, a nitrát-reduktáz aktivitása is csökken tirozin-nitráció hatására, ami a NO termelés egyik enzime, tehát a túlzott NO termelés tirozin-nitráción keresztül gátolhatja a NO termelését. (Corpas és mtsai. 2021.) *Arabidopsis thaliana*-ban a RuBisCO enzim nagy, illetve kis alegysége is tirozin-nitrálódhat hő stressz hatására, sőt az S-nitroziláció gátolhatja a RuBisCO enzim működését. (Sami és mtsai. 2018.)

## 2.1.4 A NO detektálása gyökfogó festékekkel

A NO-detektálási kísérletek során, mikroszkópos képek esetében sokszor 4,5-diaminofluoreszcein-diacetátot (DAF-2DA) használnak. Észterázok lebontják a diacetát-csoportokat, ezáltal a festék nem tud kijutni a sejtből. A festék csak élő sejtekben működik. Így a sejtben a NO oxidációs termékével, dinitrogén-trioxiddal reagálva erősen fluoreszcens triazolo-fluoreszceint hoz létre. A vizsgálatunk során a NO-ra érzékenyebb 4-amino-5-

metillamino-2',7'-difluorofluorescein-diacetát (DAF-FM DA) típusú festéket használtuk, amely hasonló elven működik (Mur és mtsai. 2011).



2. ábra DAF-FM DA hatásmechanizmusa; forrás: Goryo Chemical Research Reagent DAF-FM DA, 2022.06.16, <<https://goryochemical.com/en/research-reagent/3739/>>

## 2.2 Nehézfémek

A makroelemek mellett, a növényeknek a normális fejlődésükhöz szükségük van mikroelemekre, melyek között vannak esszenciális nehézfémek is. Ilyen a vas, réz, kobalt, cink, mangán és nikkel. Amennyiben a környezetben nagy koncentrációban vannak jelen az esszenciális nehézfémek, feldúsul a mennyiségük és ez már kóros elváltozásokhoz és mérgezéshez vezethet. Vannak olyan nehézfémek (higany, kadmium) amelyek nem szükségesek a növények számára, és a szervezetbe jutva mérgezést okoznak. A kutatás során stresszorként vasmegvonást, cink- és kadmium-kezelést alkalmaztunk.

### 2.2.1 Vashiány

A vas a legnagyobb mennyiségben előforduló fém a növényekben, nélkülözhetetlen a vas-kén centrumok, hemek felépítésében. Vashiány esetén NO-termelés indul be, amely nitrit/nitrát függő útvonalon keletkezik. A NO miatt a három, vasfelvételben fontos gén paradicsomban (*Solanum lycopersicum*) *FER*, *FRO*, *IRT1* átíródása serkentődik. A *FER* (bHLH transzkripciósfaktor paradicsomban, homológja *Arabidopsis thaliana*-ban a FIT- FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) játszhat fontosabb szerepet a NO-jel közvetítésében, mert az *IRT1* expressziója magasabb volt *FER* túlexpresszázó (OE) vonal esetében. A NO és a *FER* fontos szerepet játszhat még a gyökér növekedésében. Vasfelvételi

gének túlexpresszáltatásának vizsgálatával kiderült, hogy az expresszió fokozása önmagában nem elégséges a Fe-tartalom növeléséhez, nélkülözhetetlen a NO is, ami fokozhatja a növényen belüli vas hozzáférhetőséget (Graziano and Lamattina, 2007).

Ezt támaszthatja alá Zhu és mtsai. (2016.) kutatása, ahol putreszcinnel kezeltek vashiányos *A. thaliana* növényeket és a vashiány morfológiai elváltozása enyhült. A putreszcin a NO termelődését serkenti és *upstream* található a NO-hoz képest. A termelt NO a hemicellulóz mennyiségét csökkenti, továbbá a hemicellulóz vas kötését gyengíti, így a vas hozzáférhetőségét, végső soron a vashiány toleranciáját teszi lehetővé. A putreszcin minden esetben serkentette a NO-termelést, viszont optimális vas ellátottság esetén a putreszcin miatt növekvő NO-termelés nem serkentette a vaskészlet gének expresszióját. Valószínű, hogy vashiány esetén a NO hatással van a vaskészlet gének átíródására, de optimális vaskészlet idején már a NO nem serkenti ezen gének átíródását. Tehát mind a vaskészlet gének megfelelő működése, mind a NO szükséges a megfelelő vaskészlethez.

Wen és mtsai. (2019) kimutatták, hogy vashiány hatására a GSNOR expressziója nőtt, míg a GSNOR OE vonal esetén a klorózis mértéke, a vashiány fenotípusos megjelenése enyhült paradicsomban (*Lycopersicon esculentum*). Ez ellentétben áll a Zhu és mtsai. (2016) *Arabidopsis thaliana*-n végzett kísérleteinek eredményeivel, mivel a GSNOR a NO mennyiségét csökkenti, a NO pedig a vas hozzáférhetőségét teszi lehetővé, tehát a GSNOR OE nem enyhítené, hanem fokozná a vashiány stressz hatását. Wen és mtsai. (2019.) kimutatták, hogy vashiányosan nevelt paradicsomokban a termelő NO nem tudott felszabadítani vasat a gyökér apoptózisból, ezáltal a NO csak nitroaktív stressz forrása volt. A vashiány által kiváltott nitroaktív/oxidatív stressz okozta problémák enyhítésére a GSNOR aktivitása növekedik, amely a NO és SNO mennyiségét csökkenti. Emellett a GSNOR a vaskészletben fontos FRO1 fehérje expresszióját is serkenti, ugyanis a GSNOR expressziója és a FRO1 expressziója pozitívan korrelál.

## 2.2.2 Cink-stressz

A cink (Zn) a második legnagyobb mennyiségben előforduló átmeneti fém a vas után, és az egyetlen olyan fém, amely képviselteti magát mind a 6 enzim osztályban (oxidoreduktáz, transzferáz, hidroláz, liáz, izomeráz, ligáz) (Broadley és mtsai. 2007.). Korai vizsgálatok is kimutatták, hogy cink megvonással nevelt paradicsomok esetében a hajtás növekedése nem volt megfelelő (Skoog 1940, Abhimanyu Jogawat és mtsai. 2021). Bioinformatikai elemzések

alapján 2367 fehérje lehet kapcsolatban Zn-ionokkal *A. thaliana*-ban, mely fehérjék közül a legtöbb cink-ujj DNS kötő domén révén tartalmaz cink-iont. (Broadley és mtsai. 2007.)

A többlet Zn-ellátás azonban nehézfémstresszt okoz az élő szervezetekben. A többlet Zn több módon is képes gátolni a fotoszintézis működését. Zn-kezelt *Artemisia annua*-ban a sztomatális vezetőképesség lecsökken, ami a CO<sub>2</sub>-fixálásának csökkenését eredményezi. (Khudsar és mtsai. 2004) A Zn képes a klorofillok Mg<sup>2+</sup>-ionjainak helyébe lépni *in vitro*, ezért a II. fotokémiai rendszer fénygyűjtő antennarendszerének (LHCII) működése is gátlódhat, de *in vivo* a Zn beépülését klorofillokba még nem igazolták. (Küpper és mtsai. 2002) Magas Zn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> arány esetében a RuBisCO enzim szén-dioxid (CO<sub>2</sub>) kötése csökken, így a Calvin-ciklus működése is gátlódik. (Mateos-Naranjo és mtsai. 2008)

Sagardoy és mtsai. (2009) különböző cink koncentrációjú (1.2; 50; 100; 300 µmol ZnSO<sub>4</sub>) tápoldatokon nevelt cukorrépa (*Beta vulgaris*) növények esetében nem találtak nagy eltérést a hajtásban akkumulált cink mennyiségben. Alacsony koncentrációjú (50 µmol ZnSO<sub>4</sub>) cinkkel kezelt cukorrépa (*Beta vulgaris*) esetében és magas koncentrációjú cinkkel (300 µmol ZnSO<sub>4</sub>) kezelt növényekhez képest a hajtás cink mennyisége nem tér el nagymértékben. Azonban magas cink koncentrációnál (300 µmol ZnSO<sub>4</sub>) a klorózis mértéke és a növekedés gátlása erőteljesebb az alacsony koncentrációjú (50 µmol ZnSO<sub>4</sub>) cinktöbbséggel kezelt növényhez képest. Míg alacsony koncentrációnál (50 µmol ZnSO<sub>4</sub>) a klorózis és a morfológia megegyezik egy vashiányos növényével, addig a magas cink koncentrációval kezelt növényeknél nem feltétlenül csak a kialakuló vashiányból következik a fiziológiai és morfológiai elváltozás. A hajtás vasmennyiségében nem találtak szignifikáns különbséget 50, 100, 300 µmol-os cink kezelések következtében. A Mg<sup>2+</sup>-ion mennyisége a kontrol növényhez képest a Zn-koncentráció növekedésével szignifikánsan csökken. A Mg<sup>2+</sup>-ion a klorofillok bioszintéziséhez nélkülözhetetlen, így a klorózisért a Mg-hiány is felelős lehet. Továbbá, a kloroplasztiszok vastartalma cink-kezelés hatására lecsökken a csoportunk vastartalom mérései alapján, ami azt feltételezi, hogy a sejtplazmából a kloroplasztiszokba zajló vastranszportban okoz zavarokat a többlet cink, ugyanis a hajtásban a vas mennyisége nem csökken le szignifikánsan.

Wang és mtsai. (2009) vizsgálataiban toxikus mennyiségű Zn-kezelt (0,14-1,12 mM ZnSO<sub>4</sub>) *B. napus* esetében szignifikánsan lecsökkent a vas (Fe) mennyisége a gyökérben. Xu és mtsai. (2010) azt vizsgálták, hogy a cink által előidézett vashiány okozhatja-e a NO feldúsulását fekete csucsor (*Solanum nigrum*) gyökérben. Cinkkel kezelt növény esetében a vas hozzáadását követően 2 nappal csökkent a NO-termelés a cink kezelés után tapasztalt magas szinthez képest.

Azonban a kezeléstől számított 1 napon belül nem tapasztaltak vasszint csökkenést, viszont a NO szintje magasan volt. Ebből arra következtethetünk, hogy eleinte a Zn-indukált NO termelés a valószínű. A cink kezelt növényekben L-NAME (NOS gátlószer) alkalmazásával a NO termelése csökkent. Mivel egy Arg-útvonalon ható represszorról van szó, ezért a Zn egy Arg-dependens útvonalon serkentheti a NO-termelést.

Kolbert és mtsai. (2019) cikke szerint GSNOR funkcióvesztéses mutáns a Zn-stresszt jobban tűrte, mint a vad típusú *Arabidopsis thaliana*. Továbbá Zn-stressz következtében megnőtt a NO és S-nitrozotiol (SNO) koncentrációja, azonban GSNOR deficiens mutánsnál nem észleltek változást ezeknek a mennyiségében. A cink kezelés során enyhe emelkedést tapasztaltak a protein S-nitroziláció tekintetében a vad típushoz képest. A cink gátolja az antioxidatív enzimeket (például: aszkorbát-peroxidáz 1, (APX1)), ezért a cink ROS- (például hidrogén-peroxid;  $H_2O_2$ ) feldúsulást eredményez. A hidrogén-peroxid gátolja a GSNOR működését, ezáltal SNO mennyisége nő és az SNO képes S-nitroziláción és tirozin-nitráción keresztüli szignalizációra, amely például az APX1-re is hathat. (Kolbert és mtsai. 2019.)

### 2.2.3 Kadmium-stressz

Kadmiumstressz hatására csökken a növények vastartalma, mely háttérben a vas gyökérből hajtásba való transzportjának gátlása áll. A vastartalom mellett csökken a klorofilok és a fotokémiai reakciócentrumok mennyisége is, továbbá csak vashiánnyal összevetve erősebb a II. fotokémiai rendszer (PSII) inaktivációja Cd-stressz esetén (Yamaguchi és mtsai. 2010, Solti és mtsai. 2011, Basa és mtsai., 2014).

A Cd-kezelés vashiányt idéz elő a hajtásban, azonban ezt a vashiányt feltételezhetően nem csak a vasfelvétel gátlása okozhatja, ugyanis kadmium hatására a vasfelvételi gének serkentődnek, sőt a gyökér sejtekben megnövekedik a vas mennyisége is *A. thaliana*-ban (Xu és mtsai. 2015). Yamaguchi és mtsai. (2010) *Solanum torvum*-on végzett génexpressziós vizsgálatuk alapján felállított hipotézise szerint a Ferric Reductase Defective 3 (FRD3) gátlásával csökken a xylémnedv citrát-tartalma, csökkentve a toxikus kadmium oldódását. Ezzel szemben Xu és mtsai. (2015) kísérletei során se az *FRD3* expressziója, se a citrát mennyisége nem csökkent le szignifikánsan Cd-kezelt *Arabidopsis*-ban. Szerintük valószínűleg a megnövekedett mennyiségű pektinhez és hemicellulázhoz kapcsolódik a vas legnagyobb része a sejtfalban így gátolva a vas transzportját (Xu és mtsai. 2015). Rizsen (*Oryza sativa*) végzett vizsgálatokban kadmium kezelés következtében az *FRD3* expressziója nem változott,

azonban a citrát képes Cd-t is kötni, ezért a kadmium kötés is gátolhatja a vas transzlokációját (Sebastian és mtsai. 2018). Xu és mtsai. (2015) hipotézise szerint a hemicellulóz és pektin vas kötését a termelő NO és az etilén serkenti (Xu és mtsai. 2015). Mások a NO ellentétes hatását írták le a putreszcin és NO kapcsán, ugyanis a putreszcin növekedés hatására NO is termelődik, amely a vas hemicellulózhoz való kötését gyengíti, így a vas hozzáférhetőségét teszi lehetővé. (Zhu és mtsai. 2016) Tehát valószínű, hogy egyrészt a Cd-kezelés erőteljesebb és felborítja a NO és vasháztartást, másrészt fontos megjegyezni, hogy az egyes kezelések, az eltérő modellnövények miatt nem lehet teljesen egyértelmű következtetést levonni a kadmium kezelés és vasháztartás összefüggéseiről, illetve a NO szabályozó szerepével kapcsolatban. McInturf és mtsai (2022) vad típusú és vasat akkumuláló (*opt3-2*) *Arabidopsis*-mutánsban végeztek génexpressziós vizsgálatokat. Igen nagy átfedést találtak a vashiány és kadmium kezelés hatására expresszálandó gének közt, azonban találtak egy géncsoportot, ami csak a vad típusban indukálódott akár vashiány, akár Cd-stressz hatására, az *opt3-2* mutánsban gátolva volt. A mutánsban megnövekedett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége, modelljük szerint a reaktív oxigénformák akadályozzák a fent említett géncsoport expresszióját fokozódását. A vasháztartásban szerepet játszó gének egy másik csoportjára nem hatott ez a negatív visszacsatolás, a szerzők azt feltételezik, hogy a Cd hatására bekövetkező aktivációjuk a nem megfelelő vas érzékelés miatt következik be.

Cd hatására NO keletkezik és az Arg-függő útvonalon ható NOS represszor, az L-NAME itt is gátolja a NO termelést. A NO szintje változatlan maradt *Arabidopsis nia1nia2* kettős mutánsnál, amely mutációk a nitrit/nitrát függő útvonal NR enzim működésképtelenségét okozzák, ezáltal feltételezhető, hogy a kadmium stressz is Arg útvonalon katalizálhat NO termelést. *A. thaliana* gyökereiben Cd-kezelés hatására lecsökkent a vastartalom és magas NO-szintet eredményezett. Ez ellentétben van Xu és mtsai (2015) eredményeivel, ahol csak 10 µM CdSO<sub>4</sub>-ot alkalmaztak, míg Besson-Bard és mtsai. (2009) 30 µM Cd kezelést használtak. Ugyanazon koncentrációban kadmium és vas kezelt gyökereknél nem tapasztaltak magas NO-termelést. Kadmium kezelés során kimutatták, hogy az *IRT1*, *FRO2* és *FIT*, a vasfelvételben nélkülözhetetlen fehérjék transzkripciója csökken. Például *irt1* mutánsban a Cd-indukált NO-szintézis gátolt. Ezeknek a géneknek elsődlegesen a vasfelvételben és annak szabályozásában van szerepük, de más nehézfémek, így a Zn és a Cd transzportjában ill. annak szabályozásában is részt vesznek. Gátlásukkal a növények elérhetik, hogy a nehézfémek mennyisége ne növekedjen meg szignifikánsan. Amennyiben Cd-mal és NO-gátlóval kezelték gyökereket, a gyökér vasfelvételi rendszer génjei jobban gátlódtak, mivel a NO normál esetben serkentené e

gének működését. A kadmium a vas felvételi rendszer génjeinek működését és így közvetve a kadmium felvételt is gátolja, azonban a termelt NO a vasfelvételi géneket serkenti ezáltal növeli a Cd felvételét. (Besson-Bard és mtsai. 2009)

Az előbbieket alátámaszthatja Guan és mtsai. (2019) kutatása, amelyben arra jutottak, hogy a GSNOR aktivitása negatív korrelációt mutatott a kadmium felvételével. Tehát GSNOR aktivitásának növekedésével a Cd felvétel csökken. Ez annak köszönhető, hogy a Cd felvételében fontos szerepet játszó IRT1-et kódoló gén is negatív korrelációt mutat a GSNOR működésével, miközben *irt1* mutánsban a GSNOR változása nem okozott jelentős Cd változást. Kadmium kezelés hatására azonban az *irt1* gén átíródása serkentődött. A Cd a hajtásban indukált vashiányt okoz, melynek következtében a vasfelvételi gének (pl. *IRT1*) átíródása növekszik, ami további kadmium felvételt eredményez. Ezt a felvételt lassíthatja a GSNOR gátló hatása.

### 3 Célkitűzések

A NO-szignál fontos a növényeket ért stresszre adott válaszreakciók során. Mivel a kadmium és cink stressz is kapcsolatban állhat a vashiány általi stresszel és mindezek, a NO-termelését serkentik, ezért a célom, a cinkkel, kadmiummal, illetve vasmegvonással kezelt növények NO mennyiségének összehasonlítása, koncentrálni a kloroplasztiszok NO-szignáljára. Kutatócsoportunkban a NO-kimutatás és a protoplaszt-izolálás nem rutinművelet, célunk e módszerek optimalizálása különböző nehézfémstresszek esetén.

## 4 Anyagok és Módszerek

### 4.1 Növénynevelés

Cukorrépa (*Beta vulgaris* L. cv. Orbis) növényeket vízkultúrában, ¼ Hoagland tápoldaton, 14 óra fény ( $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusán aktív fotonfluxus-denzitás) / 10 óra sötét, 24/22 °C 70/85% relatív páratartalom körülmények között neveltük. Az összes kezelési csoportot 4

leveles állapotig 10  $\mu\text{M}$  vasat tartalmazó tápoldaton neveltünk. Az előnevelés alatt és a vashiányos növényeket leszámítva, a kezelés során, a kontroll és a vashiányos növények Fe(III)-EDTA-t, a Zn és Cd-kezelt növények Fe(III)-citrátot kaptak. 4 leveles állapotban alkalmaztuk a kezeléseket: 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ -t, 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -t, illetve teljes vasmegvonást.

## 4.2 Kloroplasztisz izolálás

0,8–1 g levélmintát 60-80 ml izoláló pufferben (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% (m/V) BSA, 0,1% (m/V) Na-askorbát) homogenizáltunk Waring blender segítségével 5 s ideig, majd a plasztiszokat 5 percig 1500  $\times g$ -n, kilendülő rotorral 4 °C hőmérsékleten centrifugálással pelletáltuk. A pelletet mosópufferrel, (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 400 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) ecset segítségével óvatosan felszuszpendáltuk. Ezt követően szintén kilendülő rotorral 5 percig 1500  $\times g$ -n centrifugáltunk. A mosási lépést még egyszer megismételtük, majd a festésig 100-200  $\mu\text{l}$  mosópufferben, jégen tartottuk a mintákat.

## 4.3 Protoplaszt izolálás

### 4.3.1 Protoplaszt izolálás Sigma enzimekkel

100–100 mg levelet zsilett pengével 1 mm széles csíkokra vágtuk, majd 400 mM mannitolban inkubáltuk egy órán át azért, hogy plazmolízis révén a sejtmembrán elváljon a sejtfalettől. 3 ml enzimoldatot (20 mM MES (pH 5,7), 400 mM mannitol, 20 mM KCl) 70 °C-on 3 percig inkubáltunk, majd 3,7% (m/V) cellulázt (Sigma, C-2274), hemicellulázt (Sigma H-2125), pektinázt (Sigma P-2401) mértünk az enzim mentes enzimoldatba. 10 perces 55 °C-os melegítés elteltével, lehűlés után hozzáadtunk 10mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, 200 mM DTT-t és 5% (m/V) BSA-t. Ezek után adtuk hozzá az enzimoldatot a csíkokra vágott levélmintákhoz, vákuuminfiltráltuk 3 $\times$  3 percig, majd 2% (m/V) PVP hozzáadásával 12 óráig inkubáltuk enyhe mozgatással. A szövettörmelékét gézrétegen leszűrve eltávolítottuk, majd 5 percig, 20 °C-on, 150  $\times g$ -n centrifugáltuk a sejtszuspenziót, majd ismételt enzimmentes oldat segítségével mostuk a sejteket. Ezután 1 M szacharózra rétegezve 50  $\times g$ -vel, 5 percig centrifugáltuk, majd a fázis határról leszívva az ép sejteket, egy 5 perces 100  $\times g$  centrifugálással, enzimmentes

enzimoldattal kimostuk a szacharózt a sejtszuspenzióból. Végül 20–50 µl-ben vettük fel a mintákat.

### **4.3.2 Protoplaszt izolálás Serva enzimekkel**

Az előzőekhez képest a plazmolizált, felcsíkozott mintákat egy enzimoldatban (2 m/V% celluláz Onozuka R10 (Serva, 16419), 0,5% (m/V) macerozim R10 (Serva, 28302), 400 mM szacharóz) emésztettük egy éjszakán át. A mintákat 5 percig 150 ×g-n centrifugáltuk, aminek hatására a sejtörmelék leülepedett, a protoplasztok pedig a felülúszó tetején gyűltek össze. Ezt leszívva, majd 0,1% (m/V) glükózt tartalmazó W5 oldattal elkeverve (2 mM MES (pH 5,7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl), a protoplasztok a mikrocentrifugacső alján ülepednek ki. Szintén 20-50 µl a Sigma enzimeknél is használt enzim mentes enzimoldatban vettük fel a protoplasztokat.

## **4.4 DAF-FM DA festés**

A kloroplasztisz- és protoplaszt-festéseket egyaránt 500 µl végtérfogatban végeztük. A festék hígítását illetve a mosási lépéseket, kloroplasztiszok esetében az izolálásnál leírt mosóoldattal, protoplasztok esetén pedig az enzim mentes enzim pufferrel végeztük. A festőoldat 5 mM 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein-diacetátot (DAF-FM DA) (Sigma, D2321) tartalmazott. 20 perces inkubálás után a kloroplasztiszokat ill. protoplasztokat az izolálási lépéseknél feltüntetett centrifugálási beállítások mellett 3× mostuk.

## **4.5 Mikroszkópos technikák**

### **4.5.1 Fluoreszcens mikroszkópia**

A képeket Spot 7.4 Slider kamerával felszerelt Nikon Eclipse 80i epifluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettük. Az összehasonlíthatóság végett minden mintát adott nagyításon azonos expozíciós idővel fotóztunk. A képek 10×, és 40× nagyítás mellett készültek FITC (475-35 Ex, 530-43 Em) ill., Cy5 HYQ (590-650 Ex, 663-738 Em) szűrőket használva.

## 4.5.2 Konfokális lézer-fluoreszcens mikroszkópia

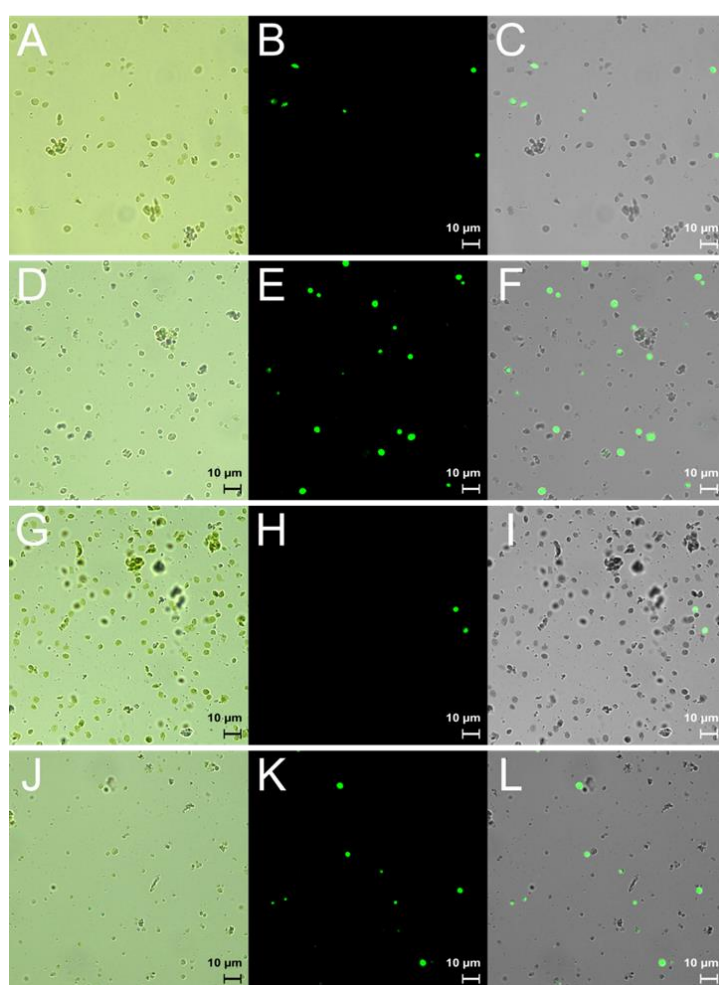
A konfokális mikroszkópi képekhez Leica SP8 típusú konfokális pásztázó mikroszkópot használtunk. A festett protoplasztokat 0,4 M szacharózt és 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS (37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) pufferben 20 percig fixáltuk, majd kétszer mostuk PBS-el. Ezt követően a mintákat ProLong Diamonddal fedtük (ThermoFisher, P36961). A DAF-FM DA-t 488 nm, a klorofillokat 638 nm hullámhosszon gerjesztettük, előbbi 510-535, utóbbit 650-690 nm-en detektáltuk.

## 4.6 Poliakrilamid gélelektroforézis és western blott

A levélmintákat 10 percig jégen szollubilizáltuk (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (m/V) SDS, 10% (V/V) glicerín and 0,001% (m/V) brómfenolkék), majd 10-18%-os gradiens poliakrilamid gélen választottuk el őket Laemmli (1970) módszere alapján. Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> premium 0,2 µm NC). A transzfert 16 órán át, 30 V-on, 4 °C-on végeztük, az alábbi puffer összetétel mellett: 25 mM Trisz, pH 8,3, 192 mM glicin, 20% (V/V) metanol, és 0,02% (m/V) SDS. A blokkolást 5% tejpörrel végeztük, elsődleges antitesttel (anti-nitro-tirozin, Sigma: N0409) 4 órán át, a másodlagos antitesttel (alkalikus foszfatáz konjugált anti-nyúl, Sigma: A3687) 1 órán át inkubáltuk. Az előhívást 0,1 M Trisz-HCl, 0,001 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9 pufferben végeztük, ami 0,4 mg ml<sup>-1</sup> NBT-t és 0,2 mg ml<sup>-1</sup> BCiP-t tartalmazott.

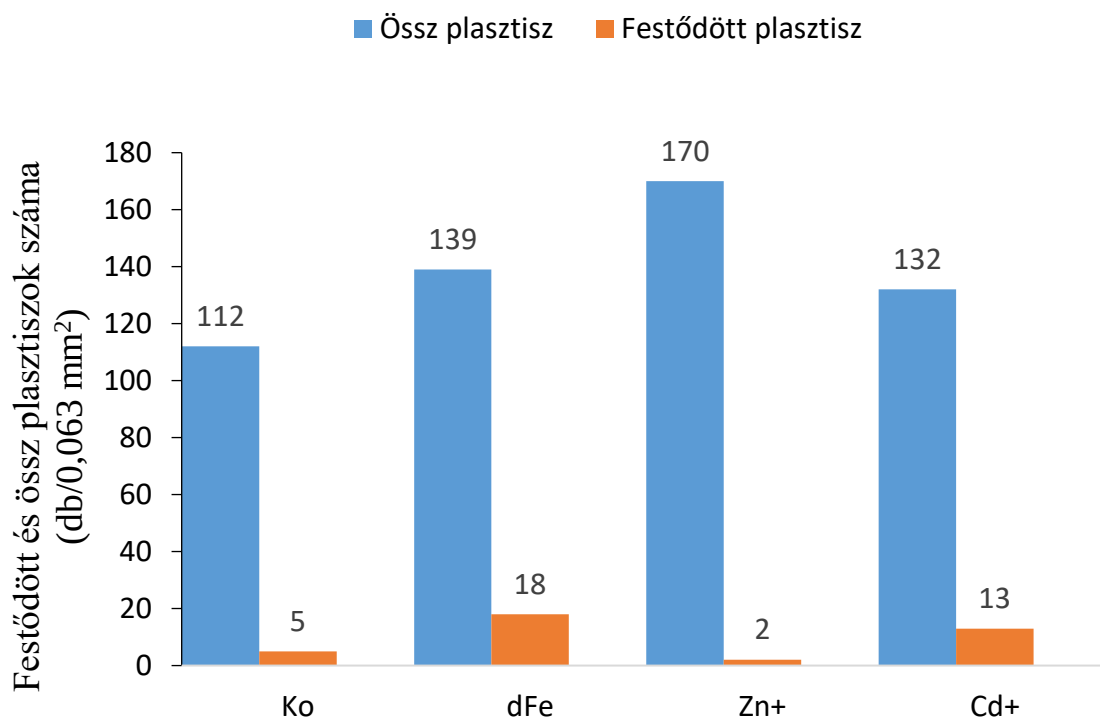
## 5 Eredmények

Az epifluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek alapján a DAF-FM DA fluoreszcencia a Cd-kezelt (3. ábra J-L) és a vasmegvonással kezelt mintákban (3. ábra D-F) a legerőteljesebb. Mindezek alapján a kloroplasztiszok az izolálás, de főleg a DAF-FM DA festést követő mosási lépések során sérülhettek. A látható fényben készült képeken jól látszódik, hogy sok a sérült kloroplasztisz, ami befolyásolhatja a DAF-FM DA festék felvételét és feltehetően a NO-termelést is, ezért a továbbiakban áttértünk protoplaszt vizsgálatra.

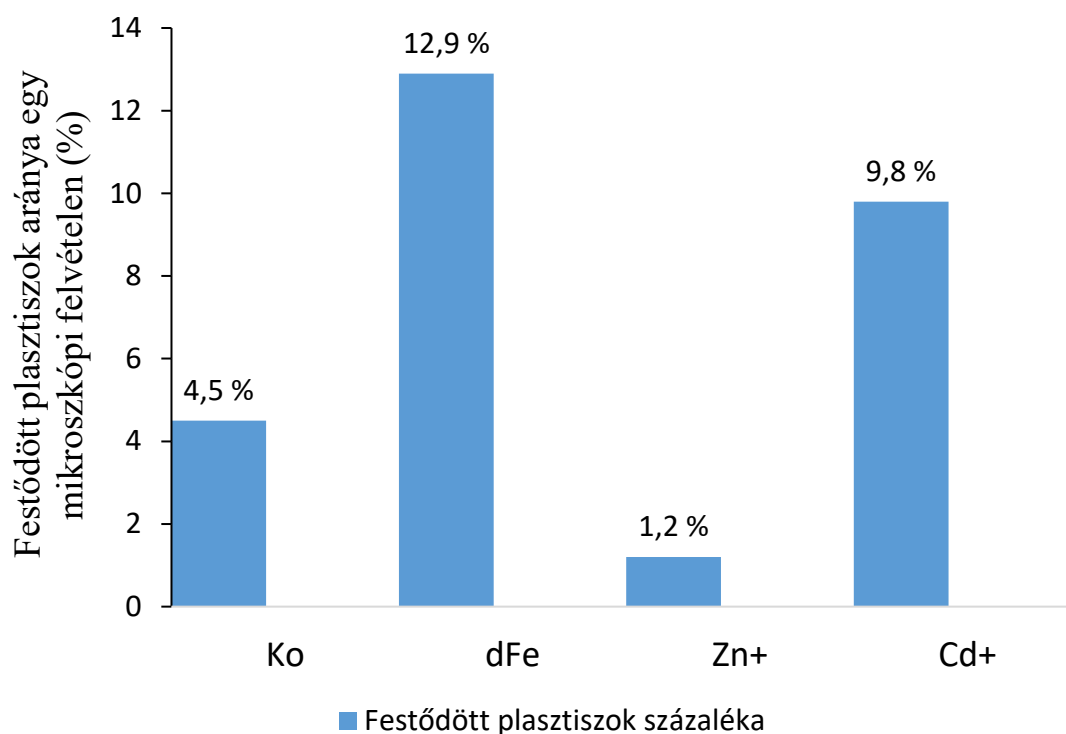


3. ábra Kloroplasztiszok fénymikroszkópban (bal), DAF-FM DA-val festve epifluoreszcens mikroszkópban (közép) és a két kép illesztése (jobb). A-C: kontroll, D-F: vashiányos, G-I: cink kezelt, J-L: kadmium kezelt minták.

A 4. és 5. ábrán az egyes mintákban festődött kloroplasztiszok száma és az összes kloroplasztiszhoz viszonyított aránya látható. Megállapítható, hogy a vashiányos és a kadmium kezelt mintáknál festődik a legtöbb kloroplasztisz és az összes kloroplasztiszhoz viszonyított arány is e mintáknál volt a legnagyobb.



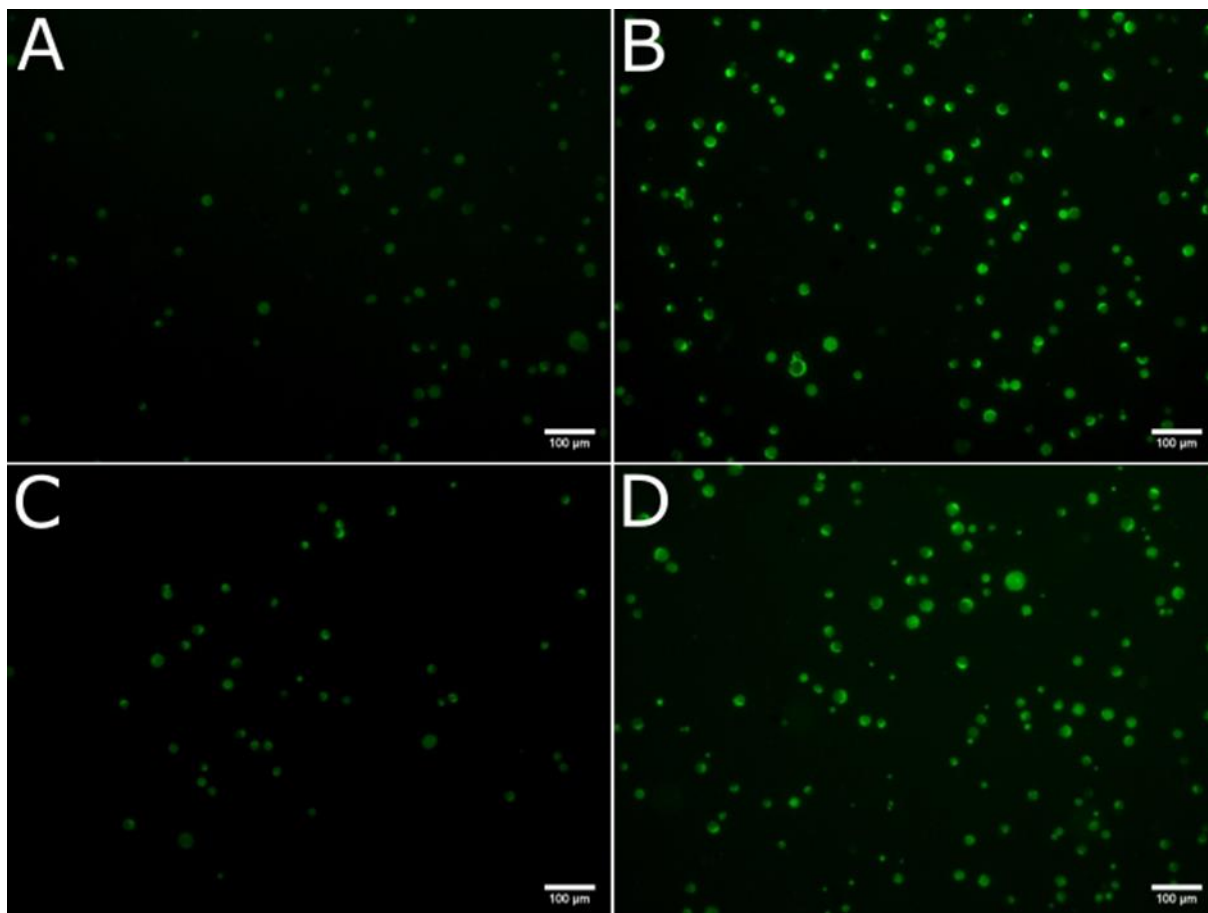
4. ábra Festődött kloroplasztiszok száma és az összes kloroplasztiszok száma egy mikroszkópi felvételen. (darabszám/0,063 mm<sup>2</sup>). Ko: kontroll, dFe: vashiányos minta, Zn+: cink kezelt minta, Cd+: kadmium kezelt minta



5. ábra Festődött kloroplasztiszok százalékos aránya az össz kloroplasztisz darabszámhoz viszonyítva egy mikroszkópi felvételen. Ko: kontroll, dFe: vashiányos minta, Zn+: cink kezelt minta, Cd+: kadmium kezelt minta

A továbbiakban a kadmium kezelt mintát +Cd-nek, a cink kezelt mintát +Zn-nek, a kontroll mintát Ko-nak, a vashiányos mintát dFe-nek fogom rövidíteni. A protoplasztokon a kloroplasztiszokhoz hasonló eredményt kaptunk, jól látszódik 10x-szeres nagyításon, 900 msec-os expozíciós idővel, hogy a +Cd minta (6.D ábra) és a dFe minta (6.B ábra) nagyobb mennyiségben tartalmazott NO-t, mint a Ko minta (A). A +Zn minta (C) esetén, az ábrán látható

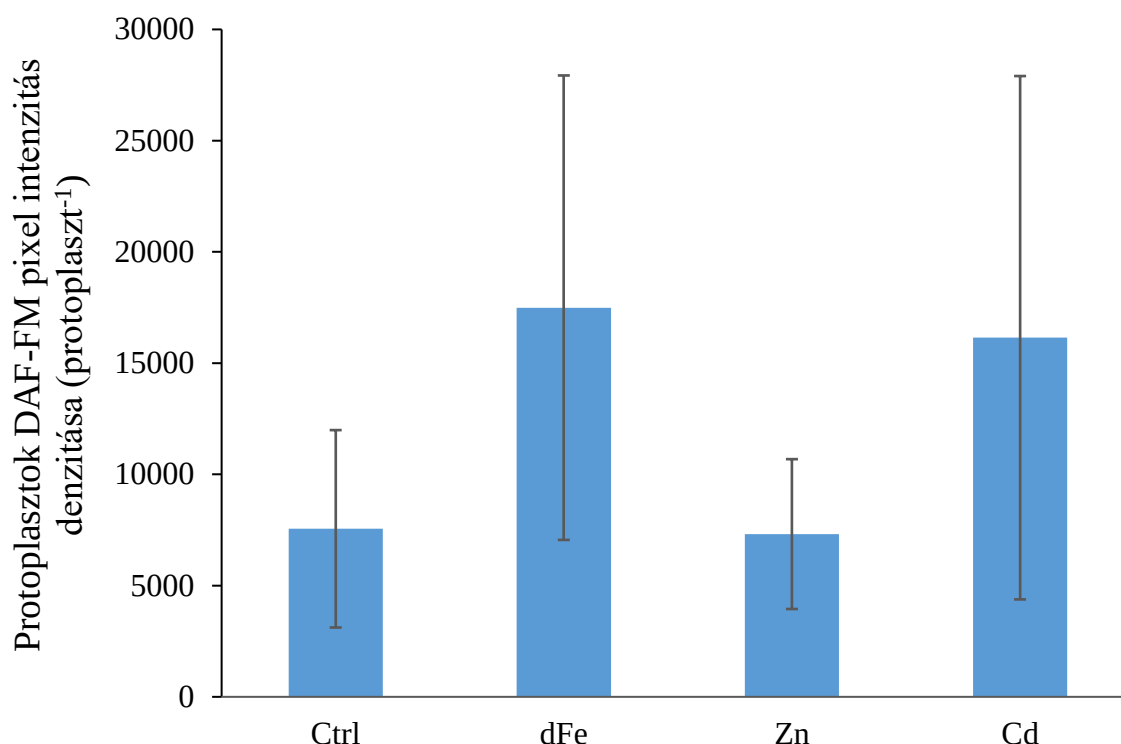
felvételhez hasonló eredményeket kaptunk. A kontrollhoz viszonyítva nem állapítható meg biztosan, hogy több vagy kevesebb NO-t tartalmaz.



6. ábra Protoplasztok DAF-FM DA-val festve, epifluoreszcens mikroszkópban 10x nagyításon  
A: Kontroll minta; B Vashiányos minta, C: Cink kezelt minta, D: Kadmium kezelt minta

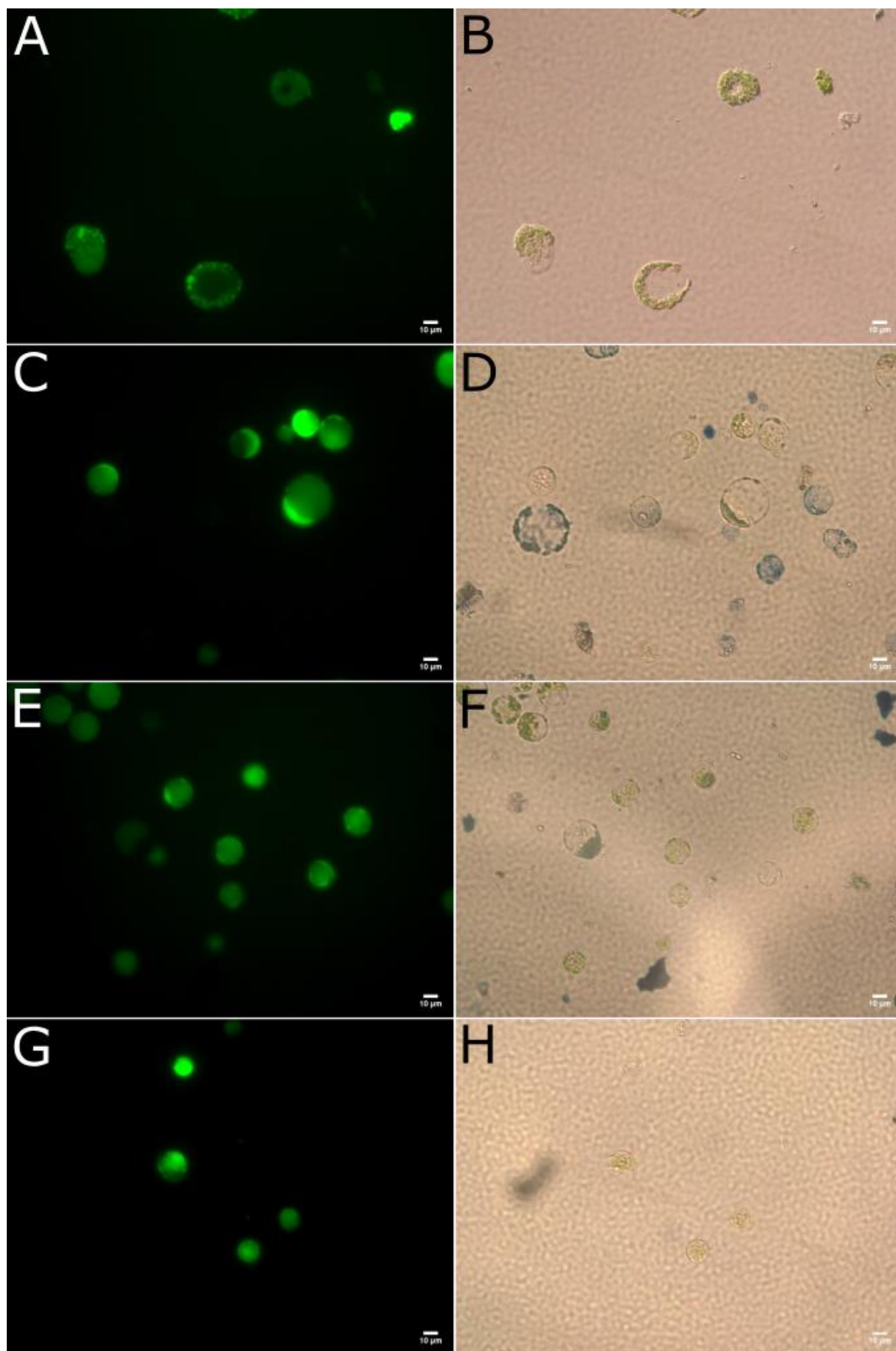
A protoplasztokat 10x-es nagyítású felvételeken denzitometráltuk Phronetix program segítségével és az átlagot és a szórást a következő ábrán illusztráltuk. A +Cd és a dFe egymáshoz képest nem, de a Ko és +Zn mintákhoz képest szignifikánsan eltér. A Ko és +Zn minták egymáshoz viszonyítva nem térnek el egymástól, tehát a +Cd és a vashiányos minták

erősebb NO jelleget mutatnak, mint a +Zn vagy a Ko minta.



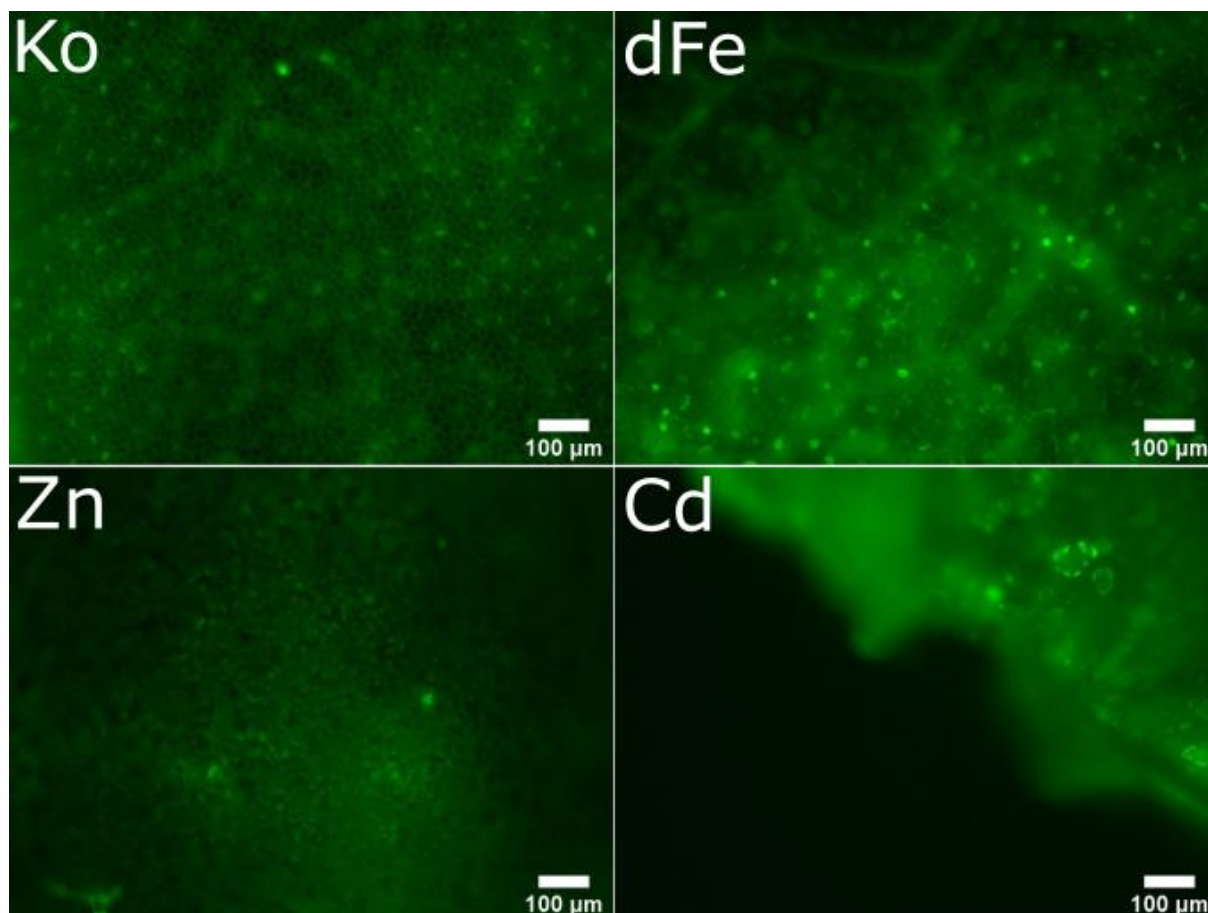
7. ábra Protoplasztok DAF-FM floureszcencia pixel intenzitás denzitometrálása látható a grafikonon. Az egyes protoplasztok pixel intenzitás csúcsait mértük. (protoplaszt<sup>-1</sup>). Ctrl: kontroll, dFe: vashiányos minta, Zn: cink kezelt minta, Cd: kadmium kezelt minta

40-szeres nagyításon készült képeken (8. ábra), látható, hogy a NO jelenlétét jelző zöld floureszcencia diffúzan jelenik meg a protoplasztok citoplazmájában, de úgy tűnik, hogy a plasztiszokban vagy azok közvetlen környékén (vö.: floureszcens mikroszkópai és látható fényben készült képeket) erősebb a NO-ra utaló jel. A cink kezelt minta továbbra sem mutatott konzekvens eredményeket a kontroll mintához viszonyítva.



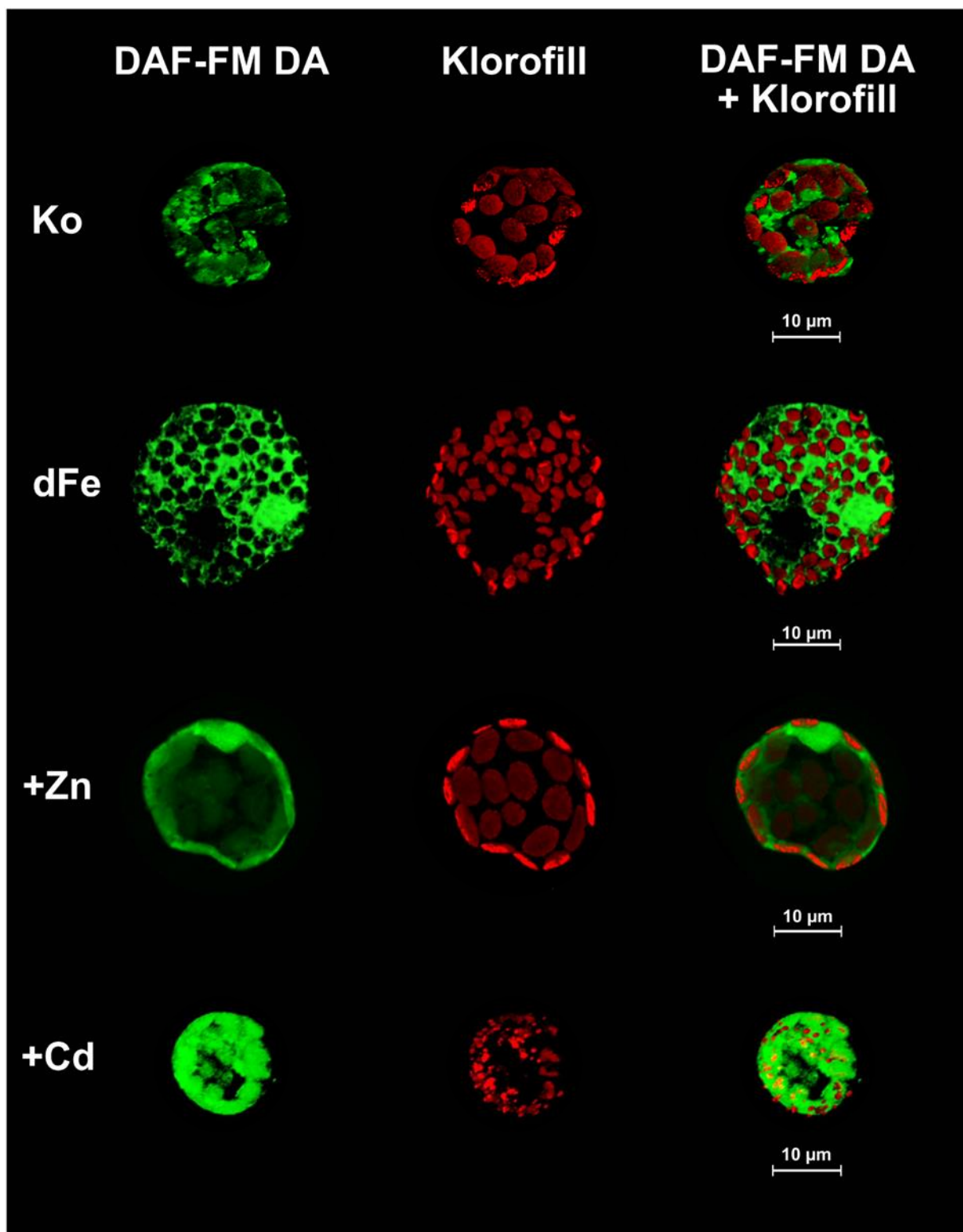
8. ábra Protoplasztok DAF-FM DA-val festve 40x nagyításon epifluoreszcens mikroszkópban (fluo) és látható fényben (f.fény). A A: Kontroll fluo; B: Kontrol f.fény és fluo kompozit; C: Vashiányos fluo; D: Vashiányos f.fény és fluo kompozit; E: Cink kezelt.

Azért, hogy a mezofillum sejtjeit tudjuk vizsgálni élő szövetben, ezért levélkorongokat festettünk DAF-FM-el, majd ezeket epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Szintén a +Cd és a dFe minták mutatják erőteljesebben a NO szignált.



9. ábra Levélkorongok DAF-FM-el festve, Ko: kontroll minta; dFe: vashiányos minta; Zn: cink kezelt minta; Cd: kadmium kezelt minta.

Pontosabb NO lokalizáció érdekében, konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal is készítettünk képeket. A 10. ábrán látható felvételek alapján, a vörössel jelölt klorofill autofluoreszcencia és a DAF-FM DA festődés nem fed át, tehát feltételezhető, hogy a stressz hatására keletkező NO nem tilakoidokban vagy közvetlen közelükben található. A klorofill fluoreszcencia alapján látható, hogy a +Zn növények tilakoid ultrastruktúrája nem tér el nagyon a Ko-tól, míg a vashiányos növénynek sokkal kisebb plasztiszai vannak, a +Cd mintában pedig elszórtan, jóval kevésbé organizáltan jelenik meg a klorofill autofluoreszcencia, feltételezhető, hogy a fénygyűjtő apparátus roncsolódott kadmium hatására.

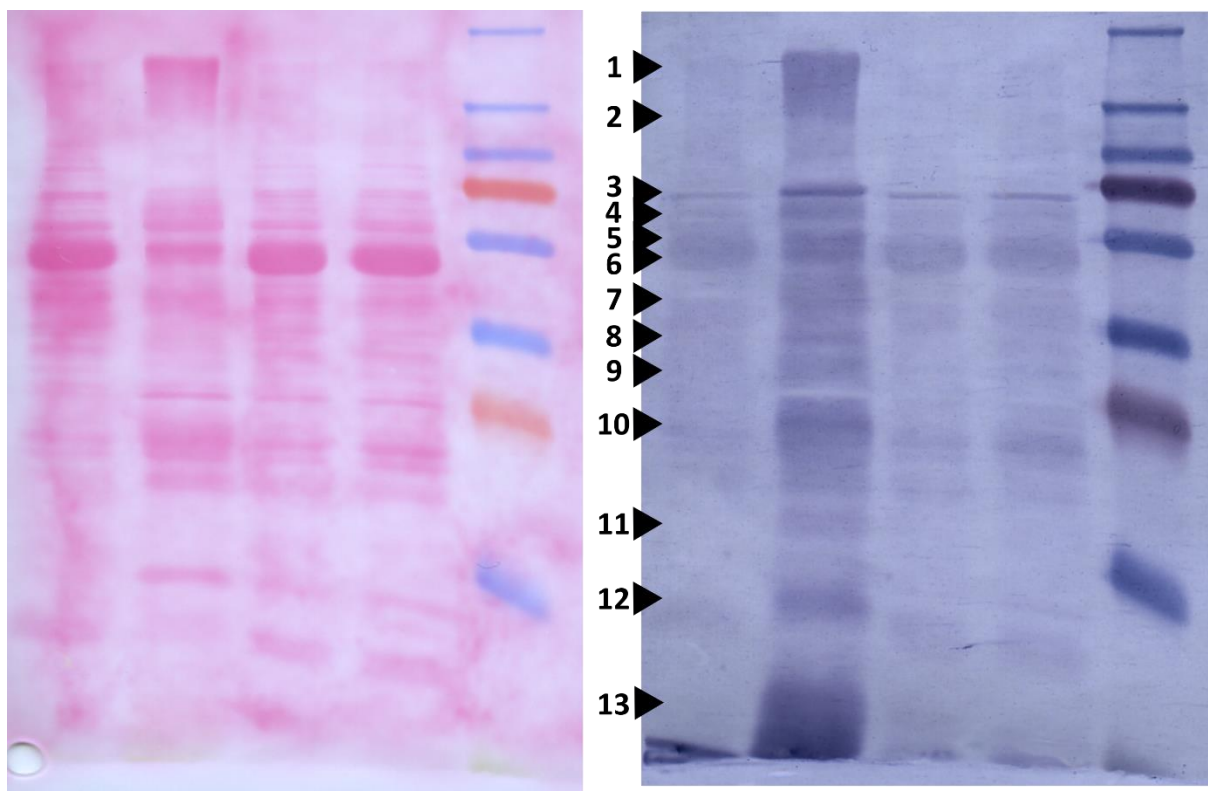


10. ábra Protoplasztok DAF-FM DA-val festve és klorofill autofluoreszencia. Ko: Kontroll; dFe: vashiányos minta; +Zn; cink kezelt minta; +Cd: kadmium kezelt minta.

1. táblázat: Az izolálás során használt enzimmennyiségek  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  egységre számítva a következő táblázat tartalmazza.

| Az enzim neve:     |                                               | Használt koncentráció (m/V%) | Unit egysége ( $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) | ml egységre vetítve ( $\mu\text{mol ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |
|--------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Sigma celluláz     |                                               | 3,7                          | 4                                                     | 148                                                          |
| Sigma pektináz     |                                               | 3,7                          | 30                                                    | 1110                                                         |
| Sigma hemicelluláz |                                               | 3,7                          | 0,026                                                 | 1                                                            |
|                    |                                               |                              |                                                       |                                                              |
| Serva celluláz     |                                               | 2                            | 60                                                    | 1200                                                         |
| Serva pektináz     | (Serva macerozyme enzim koktél egyes enzimei) | 0,5                          | 30                                                    | 150                                                          |
| Serva hemicelluláz |                                               | 0,5                          | 0,25                                                  | 1,25                                                         |
| Serva celluláz     |                                               | 0,5                          | 6                                                     | 30                                                           |

A kísérlet során a NO egy fontos hatását, a tirozin-nitrációt is vizsgáltuk, mint poszt-transzlációs szabályozó folyamat. Nitro-tirozin antitest segítségével, western blott technikával készítettük a felvételeket. A 11. ábra bal oldalán Ponceau festéssel a membránra transzferált fehérjék látszódnak, míg a jobb oldalon anti-nitrotirozinnal jelölődő nitrált fehérjék figyelhetők meg. A Zn kezelt mintán figyelhető meg a legerőteljesebb festődés, ami azt mutatja, hogy a Zn kezelés következtében nagy mértékű tirozin-nitráció következik be. A Zn kezelt mintában 13 fehérje sávot tudunk elkülöníteni, amely a többi mintában kevésbé jelölődött. További vizsgálatok nélkül, csak a növényi szervezetekben előforduló legnagyobb mennyiségű fehérjét lehet azonosítani, amely a RuBisCO (11. ábra 6-os nyíl).



11. ábra Bal oldalt Ponceau festéssel a membránra transzferált fehérjék, jobb oldalt az anti-nitro-tirozin jelölés látható. Az egyes ábrákon balról jobbra haladva: +Cd mintá; +Zn mintá; dFe mintá; Ko mintá; létra.

## 6 Diszkusszió

A kloroplasztiszokban látható nitrogén-monoxid jel a vizsgálataink során nem mutatott konzekvens eredményeket cink kezelt és kontroll esetén, kadmium kezelt és vashiányos minta esetén erősebb jelet kaptunk a többi mintához viszonyítva. A cink kezeltből izolált kloroplasztiszoknál a NO jelleg nem mutatott konzekvens eredményeket a kontroll mintához viszonyítva. Mindezek mellett az egyes mintákon belül sem volt egységes a kloroplasztiszok festődése, gyengén és erősen festődő kloroplasztiszok egyaránt láthatóak voltak a mintákban. A fénymikroszkópos képek alapján a kloroplasztiszok morfológiájából látható, hogy a plasztiszok intaktsága vegyes, ami szintén befolyásolhatja az eredményeket. Megfigyelhető volt, hogy a plasztiszok csak kevés hányada adott jelet a kontroll és a cink kezelt mintákban, vashiány-, legfőképp azok, melyek már az intaktságukat elveszítették. Ezt az ellentmondásos eredményt valószínűsíthető, hogy az izolálás során ért stressz miatt bekövetkezett NO-termelés okozhatta egy bizonyos részben. Azonban a hipotézisünket, miszerint a vashiányos és a kadmium kezelt minták erősebben festődnek, a kloroplasztiszok festődése is mutathatja, ugyanis a festődött kloroplasztiszok aránya az össz kloroplasztiszhoz képest is ebben a két mintában volt a legmagasabb.

Azért, hogy a sejtből bekövetkezett NO szignál változásokat is figyelemmel tudjuk kísérni, a vizsgálataink a sejtfal nélküli mezofillum sejtekre irányultak. Az izolált protoplasztok több ideig megőrzik épségüket, mint az izolált kloroplasztiszok, így a protoplasztok miatt konzekvensabb eredményeket vártunk. Eleinte Sigma-s enzimekkel dolgoztunk a szakirodalomban talált protokolloknak megfelelően 16 órás inkubálási idővel. Azonban a protoplasztok épsége és sűrűsége izolálásonként eltérő volt. Az izoláló oldat tartalmazott DTT-t és PVP-t hiszen ezeket a vashiányos növények protoplaszt izolálásánál González-Vallejo és mtsai. 2000-ben a nélkülözhetetlen összetevőnek írták le az enzimidatban. Már 1980-ban Schmidt és Poole vizsgálata során kiderült, hogy a DTT alkalmazása nélkül a protoplaszt sűrűség korántsem akkora, mint DTT-vel való izolálás során. Ezt követően váltottunk Servas enzimekre, amely során az egész éjszakás emésztés következtében a cink kezelt mintákat leszámítva kevés ép, gömbölyded, homogén plasztiszokkal rendelkező protoplasztot tudtunk izolálni. Míg a korábbi módszerrel rendszerint alacsony sejtsűrűségű és rossz intaktságú protoplasztokat izoláltunk cink kezelt növényekből, addig az új módszerrel intakt és magasabb denzitású protoplaszt szuszpenziót tudtunk izolálni. Ennek hátterében az állhat, hogy a

fém-többletet tartalmazó növények sejtfaiba berakódnak a fémek, ezáltal feltételezhetően a sejtfal az enzimeknek jobban ellenáll. Krzesłowska 2010-es publikációjában leírta a túlzott fémfelvétel következtében kialakuló sejtfalvastagodást, ami például gyökerekben gátolja a további fémfelvételt. Továbbá a Zn bizonyos szinten képes gátolni a celluláz működését (Eryavuz és mtsai. 2009) Teszteltük a rövidebb (3-4 órás) enzimes emésztés hatását is, a cink kezelt minta kivételével intakt és megfelelő denzitású protoplaszt szuszpenziót kaptunk, míg 3 óra alatt a cink kezelt növények leveleiből elenyésző, a vizsgálatokhoz messze nem elegendő mennyiségű protoplaszt szabadult ki. Az 1. táblázatban látható az izoláló enzimek aktivitásának összehasonlítása, melyből kiderül, hogy a két módszer között a celluláz és pektináz egymáshoz viszonyított aránya jelentősen eltér. Mivel a Serva enzimdátban kevesebb pektináz volt, ezért feltételezhető, hogy a cink kezelt mezofillum sejtekben több pektin található. A cink kezelt cukorrépa levelei keményebbek is voltak a többi növényhez képest. A továbbiakban tervezzük, hogy a cink kezelt mintákat vagy magasabb enzim mennyiséggel vagy hosszabb ideig inkubáljuk mint a többi kezelés növényeit.

Tewari és mtsai. (2012) vizsgálatai alapján viszont nem kizárható, hogy a nehézfémkezeléstől független, atipikus NO termelést is kimutattunk, ugyanis a protoplaszt izolálás során is éri stressz a sejteket, tehát az izolálás utáni mikroszkópos vizsgálatok a nehézfémstressz általi NO termelés mellett, az izolálás miatti NO termelést is megjelenítik. Véleményünk szerint, mivel mindegyik mintát azonos módszerrel izoláltuk, ezért a mintákon megjelenő izolálásból származó többlet NO azonos mennyiségű lehet minden egyes mintán, ezért a nehézfém-stresszek összehasonlítására alkalmas lehet a módszer.

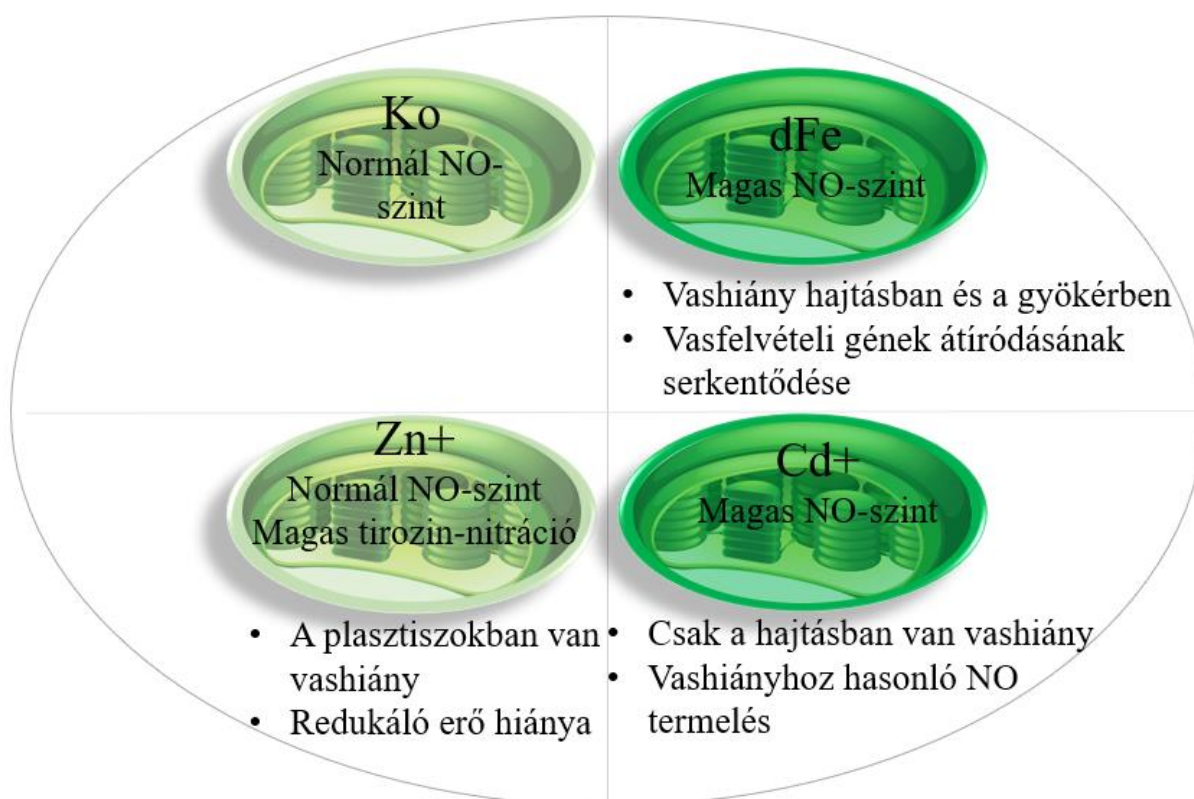
A protoplasztálási folyamat esetleges NO termelést befolyásoló hatását kizárva szeretnénk tanulmányozni a natív NO termelést is, ehhez még ki kell dolgoznunk annak a módszerét, hogy tudunk kellően vékony intakt mezofillum mintákat előállítani, megfesteni és konfokális lézer pásztázó mikroszkópban vizsgálni. Továbbá Tewari és mtsai. (2012) eredménye alapján az izolált protoplasztokat megfelelő táptalajon fenntartva 1-2 napig, az izolálásból származó többlet NO elbomlana és abban az esetben csak a nehézfémstressz általi NO maradna. Amennyiben csak kontroll növényből izolálnánk protoplasztot, majd szintén 1-2 napig fenntartva táptalajon és utána kapnának nehézfémkezelést a sejtek, akkor egyszerűbben, akár a kezeléstől számítva, adott időközönként véve mintákat lehetne mikroszkópi vizsgálatokat végezni.

A 6. és 8. számú fluoreszcens mikroszkópi ábrák egyértelműen látszódik, hogy a kadmium kezelt és a vashiányos mintákban jelentősen erősebb a NO szignál, mint a kontroll növényben. Kezelést 4 leveles állapotban kapták a növények, az izolálás pedig a kezelést követő második héten végeztük, tehát a nehézfém- vagy vashiány stressz megjelenése és az izolálás között sok idő telt el. A fentebbi eredmény, tehát összhangban van korábbi eredményekkel (Xu és mtsai. 2010, Besson-Bard és mtsai. 2009), miszerint a nehézfém kezeléstől számított 1-2 napon túl már a vashiány általi NO termelés veszi át a szerepet. Ezért a vashiányos és kadmiummal kezelt mintáknál hasonló NO mintázatot kell látnunk. Az egy szempontos varianciaanalízis és a Tukey-Kramer statisztikai tesztek kimutatták, hogy a kadmium kezelt és vashiányos minták NO jellege szignifikánsan eltér a kontroll növény NO jellegéhez képest, de a cink kezelt mintáknál nem állapítható meg különbség (7. ábra). Az adatok szórása nagyon magas, ami a festés és a mérés nem kvantitatív voltából ered, ugyanis a festék fluoreszcenciája a festék sejt béli elhelyezkedésének a függvényében változhat, ami szóródást okoz. Tehát a módszer összehasonlításra alkalmazható, de kvantitatív mérésre nem. A szórást a továbbiakban is szeretnénk csökkenteni a mintaszám növelésével. A szakirodalmi eredmények alapján (Wang és mtsai. 2009, Xu és mtsai. 2010) cinkkel kezelt növény esetében is a vashiányos mintához kellene hasonlítania, azonban a hajtásban, a gyökérrel ellentétben, elegendő vas található, ami feltehetően nem indítja el, a vashiány szignálként működő NO termelését. Sagardoy és mtsai. 2009-es cikkében leírták, hogy cink kezelés következtében, csak enyhe vasszint csökkenést tapasztaltak a kontroll növényhez képest, tehát egy nagyon enyhe NO szignál feltételezhető a vashiány következtében, ezért sem láthatunk egyértelmű NO szignál változást. Továbbá Shinozaki és Yoshimoto (2021) modellje szerint, a vas és cink háztartás szoros kapcsolatban van, cink hiány esetén a növények több vasat vesznek fel, cink többlet esetén viszont a vasszint csökken, a növény pedig autofágia révén reciklizálja a hiányzó vasat vagy cinket. A cink kezelés alatt nőtt cukorrépa levelek igen kis felületűek, nem sokkal nagyobbak, mint az előnevelés alatt kifejlődött négy levél, szemben a többi kezeléssel, ahol a kezelés alatt fejlődött levelek mérete az első levelek méretének többszöröse. Megfigyeléseink alapján, a cink kezelt növényekben a kezelés előtt fejlődött levelek igen hamar elhalnak, feltételezhető, hogy az előnevelés alatt kapott vasat transzlokálja az újonnan növekvő levelekbe, így fenntartva azon élettani folyamatokat, amelyekhez szükséges a vas.

Az eddigi vizsgálatainkat is alátámasztja a mezofillumról készült ábra, ugyanis látható, hogy a dFe és a +Cd minták erőteljesebbek a másik két mintánál. Továbbiakban szeretnénk metszetet is készíteni a mintákból. Leginkább a szállítónyaláb sejtjei, a szőrsejtek és a sztóma

zárósejtjei halmoznak fel NO-ot. Korábban Besson-Bard és mtsai. (2009.) is arra jutottak, hogy a sztóma sejtjei és a felszíni szőrsejtek halmoznak fel leginkább NO-t és ezek azok a sejtek melyek előszeretettel halmoznak fel kadmiumot is. Ez összhangban van Gould és mtsai. (2003.) eredményeivel, ugyanis hőmérsékleti- és só stresszre szintén a szőrsejtekben és a sztóma sejtekben volt jelentős NO termelés. A konfokális mikroszkópi felvételeket tartalmazó 10. ábrán, amennyiben a vörös színű klorofill autofluoreszcencia és a zöld DAF-FM DA jel átfed, akkor sárga jelet kéne kapnunk. Azonban a konfokális felvételeken jól látszódik, hogy nincs sárga jel. Tehát a kloroplasztiszok tilakoid rendszerének közvetlen közelében nem található NO. Mivel a kisebb nagyítású képeken azt látjuk, hogy a plasztiszok közelében van erőteljesebb NO festődést, ezért továbbra is kérdéses, hogy pontosan hol lokalizálható NO.

A gélelektroforézis után készített Ponceau fehérjefestéssel megfestett ábrán (11. ábra) látható, hogy azonos mennyiségű fehérjét futtatunk a gélen. A +Zn minta esetében (balról a második) a RuBisCO nem olyan erős a Ponceau festésnél, mivel a Zn kezelt növényekből az izolált kloroplasztiszok kevésbé voltak intaktak a többi izoláláshoz képest. A blott-on egyértelműen látszódik, hogy a +Zn minta esetében a legerőteljesebb a tirozin-nitráció. A RuBisCO képes tirozin-nitrálódni és a +Zn mintánál a RuBisCO vonala nagyon erős jelet ad. A 13 bejelölt fehérje sávból a RuBisCO-n kívül más fehérjét nem tudtunk beazonosítani. Például egy sávban több fehérje is lehet, ezért tervezünk Blue Natív elválasztást vagy izoelektromospont fókuszálást végezni az SDS gélelektroforézis előtt, majd anti-nitro-tirozin festést követően a jelölődött fehérjéket szekvenálnánk és azonosítanánk. A Zn kezelés alacsony NO szintjét egyrészt az okozhatja, hogy a mezofillum sejtek citoplazmája nem nagy mértékben vashiányos, ezáltal a vashiány szignálnak gondolt NO szintje kevésbé fog emelkedni. Másrészt a +Zn mintában észleltük a legnagyobb mennyiségű tirozin-nitrációt, tehát a termelődő NO a tirozin-nitrációban vesz részt, így a DAF-FM-el nem tudjuk a tirozin-nitrációban részt vevő NO-t detektálni. Mivel a tirozin-nitráció gátolja az antioxidatív enzimeket és a Zn kezelt mintában észleltük a legmagasabb tirozin-nitrációt, ezért feltehetően a Zn kezelt növényben van a legerősebb nitrozatív stressz, mely a morfológiáján meg is látszik, ugyanis a Zn kezelt növényeknek kisméretűek a levelei és korai szenescencia is megfigyelhető. A tirozin-nitráció gátolja a nitrát-reduktáz aktivitását (Corpas és mtsai. 2021), amely két héttel a kezelés után a legfőbb NO termelődési útvonal lehet (Xu és mtsai. 2010), tehát egy esetleges feedback gátlás miatt is nem látunk megnövekedett NO jelet a Zn kezelt mintában. A többi mintában nem észlelhető különbség a Ko mintához képest tirozin-nitrációt illetően.



12. ábra Összefoglaló ábra az eredményeinkről az irodalmi bevezetővel kiegészítve. A protoplaszton belüli egyes plasztiszok színének erőssége a DAF-FM jel erősségére utal. Ko: kontroll, dFe: vashiányos minta, Zn+: cink kezelt minta, Cd+: kadmium kezelt minta, Forrás: saját ábra

## 7 Összefoglalás

Kísérleteim során vashiány, cink és kadmium kezelés hatását vizsgáltam izolált kloroplasztiszokon és protoplasztokon. A NO leginkább kadmium és vasmegvonással kezelt növények esetében mutatott magas szintet. Kezeléstől számított több nap után mind a cink, mind a kadmium stressz következtében vashiány alakul ki, amely leginkább felelős lehet a NO termeléséért hosszabb távon. A NO szintje az egyes kezelések következtében eltérő volt, ami feltehetően a növények különböző mértékű vashiányából fakad. A plasztiszok töredékében volt látható NO jel, ami összhangban van a konfokális felvételekkel, miszerint a tilakoid közvetlen közelében NO nem lokalizálható. A kezelések hatására a sejtfal összetétel is megváltozik, mert más-más enzim összetételű oldatokban különböző inkubálási időkkel emésztődnek a mezofillum sejtek. Ez leginkább a cink kezelt minta esetében volt megfigyelhető, ugyanis magas pektináz tartalmú oldatban gyorsabban emésztődtek a sejtek.

## 8 Szerzői hozzájárulás

A növénynevelést, kloroplasztisz-izolálást, protoplaszt-izolálást, festést, epifluoreszcens mikroszkópi munkát én végeztem Zelenyánszki Helga felügyelete alatt. A konfokális lézermikroszkópi képeket dr. Visnovitz Tamás ill. Koncz Anna készítette. A gélelektroforézist és a western blottot Zelenyánszki Helga végezte.

## 9 Irodalomjegyzék

- Arasimowicz-Jelonek, M., & Floryszak-Wieczorek, J. (2019). A physiological perspective on targets of nitration in NO-based signaling networks in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 4379-4389.
- Basa, B., Lattanzio, G., Solti, Á., Tóth, B., Abadía, J., Fodor, F., & Sárvári, É. (2014). Changes induced by cadmium stress and iron deficiency in the composition and organization of thylakoid complexes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 101, 1-11.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., ... & Wendehenne, D. (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, 149(3), 1302-1315.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677-702.
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., & Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, 102(5), 460-462.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2021). Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress*, 2, 100026.
- Deeb, R. S., Nuriel, T., Cheung, C., Summers, B., Lamon, B. D., Gross, S. S., & Hajjar, D. P. (2013). Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(5), H687-H698.

- Eryavuz, A., & Dehority, B. A. (2009). Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 151(3-4), 175-183.
- González-Vallejo, E. B., Morales, F., Cistué, L., Abadía, A., & Abadía, J. (2000). Iron deficiency decreases the Fe (III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 122(2), 337-344.
- Gould, K. S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell & Environment*, 26(11), 1851-1862.
- Graziano, M., & Lamattina, L. (2005). Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in Plant Science*, 10(1), 4-8.
- Graziano, M., & Lamattina, L. (2007). Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal*, 52(5), 949-960.
- Guan, M. Y., Zhu, Y. X., Liu, X. X., & Jin, C. W. (2019). Induction of S-nitrosoglutathione reductase reduces root cadmium uptake by inhibiting Iron-regulated transporter 1. *Plant and Soil*, 438(1), 251-262.
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., & van Dongen, J. T. (2011). On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science*, 16(3), 160-168.
- Jahnová, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). S-nitrosoglutathione reductase—The master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants*, 8(2), 48.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., & Puntarulo, S. (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 142(3), 1246-1255.
- Jogawat, A., Yadav, B., & Narayan, O. P. (2021). Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 259-275.
- Khudsar, T., Iqbal, M., & Sairam, R. K. (2004). Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. *Biologia Plantarum*, 48(2), 255-260.
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., ... & Hancock, J. T. (2019). A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*, 93, 53-70.

- Kolbert, Z., Molnár, Á., Oláh, D., Feigl, G., Horváth, E., Erdei, L., ... & Lindermayr, C. (2019). S-Nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 60(11), 2449-2463.
- Krzesłowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 35-51.
- Küpper, H., Šetlík, I., Spiller, M., Küpper, F. C., & Prášil, O. (2002). Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation1. *Journal of Phycology*, 38(3), 429-441.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Luque, T., & Figueroa, M. E. (2008). Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biology*, 10(6), 754-762.
- McInturf, S. A., Khan, M. A., Gokul, A., Castro-Guerrero, N. A., Höhner, R., Li, J., ... & Mendoza-Cózatl, D. G. (2022). Cadmium interference with iron sensing reveals transcriptional programs sensitive and insensitive to reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany*, 73(1), 324-338.
- Mur, L. A., Mandon, J., Cristescu, S. M., Harren, F. J., & Prats, E. (2011). Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Science*, 181(5), 509-519.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., & Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology*, 11(3), 339-350.
- Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., Siddiqui, H., Yusuf, M., & Hayat, S. (2018). Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide*, 73, 22-38.
- Schmidt, R., & Poole, R. J. (1980). Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. *Plant Physiology*, 66(1), 25-28.
- Sebastian, A., & Prasad, M. N. V. (2018). Exogenous citrate and malate alleviate cadmium stress in *Oryza sativa* L.: Probing role of cadmium localization and iron nutrition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 215-222.
- Skoog, F. (1940). Relationships between zinc and auxin in the growth of higher plants. *American Journal of Botany*, 939-951.

- Solti, Á., Sárvári, É., Tóth, B., Basa, B., Lévai, L., & Fodor, F. (2011). Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(5), 494-498.
- Tewari, R. K., Watanabe, D., & Watanabe, M. (2012). Chloroplastic NADPH oxidase-like activity-mediated perpetual hydrogen peroxide generation in the chloroplast induces apoptotic-like death of *Brassica napus* leaf protoplasts. *Planta*, 235(1), 99-110.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., & Lin, Z. P. (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, 75(11), 1468-1476.
- Wen, D., Sun, S., Yang, W., Zhang, L., Liu, S., Gong, B., & Shi, Q. (2019). Overexpression of S-nitrosogluthathione reductase alleviated iron-deficiency stress by regulating iron distribution and redox homeostasis. *Journal of Plant Physiology*, 237, 1-11.
- Xu, J., Yin, H., Li, Y., & Liu, X. (2010). Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology*, 154(3), 1319-1334.
- Xu, S. S., Zu Lin, S., & Lai, Z. X. (2015). Cadmium impairs iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by increasing the polysaccharide contents and the iron-binding capacity of root cell walls. *Plant and Soil*, 392(1), 71-85.
- Yamaguchi, H., Fukuoka, H., Arao, T., Ohyama, A., Nunome, T., Miyatake, K., & Negoro, S. (2010). Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 423-437.
- Zhu, X. F., Wang, B., Song, W. F., Zheng, S. J., & Shen, R. F. (2016). Putrescine alleviates iron deficiency via NO-dependent reutilization of root cell-wall Fe in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 170(1), 558-567.
2. ábra: Goryo Chemical Research Reagent DAF-FM DA, 2022.06.16, <<https://goryochemical.com/en/research-reagent/3739/>>

## 10 Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K-135607 pályázata támogatta. Továbbá, a Versenyképes Közép-Magyarország Operatív program VEKOP 2.3.3-15-2016-00008 pályázata és a Tudományszervezési és Kutatási Pályázat TKP 2020-IKA-05 pályázata is hozzájárult a kutatáshoz.

Köszönöm dr. habil. Solti Ádámnak, hogy lehetővé tette a dolgozatom elkészültét és köszönöm szakmai segítségét a dolgozat elkészítésében.

Köszönöm Zelenyánszki Helga odaadó segítségét és szakmai felkészítését.

Hálás vagyok prof. dr. Kovács M. Gábornak és dr. Knapp Dánielnek, hogy használhattam az ELTE TTK Növény szerkezettani Tanszéken az epifluoreszcens mikroszkópot.

Hálás vagyok dr. Preininger Évának (ELTE Növény szerkezettani Tsz.) a protoplaszt-izoláláshoz használt Serva enzimekért.

Köszönöm Koncz Annának és dr. Visnovitz Tamásnak (SE) konfokális mikroszkópiai felvételek elkészítését és a minta-előkészítésben adott tanácsait.