

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék



36. OTDK Biológia Szekció

A hipuzináció gátlására használt ciklopirox hatása a különböző életkorú paradicsom növények fejlődésére

Pálfi Péter

Biológus MSc szakos hallgató, II. évfolyam

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Szepesi Ágnes

egyetemi adjunktus

2022

1. Absztrakt

A hipuzin aminosav, a vele kapcsolatos fél évszázados kutatás jelenlegi állása szerint, kizárólag az eukarióta iniciációs faktor 5A (eIF5A) translációt segítő fehérje aktivált formájában van jelen a kétlépéses bioszintézisét követően. A translációs faktort aktiváló hipuzinációs folyamat mindkét lépése külön enzimet igényel, melyek a dezoxihipuzin-szintáz (DHS; EC 2.5.1.46) és a dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH; EC 1.14.99.29). A DOHH katalizálja a hipuzin bioszintézisének második lépését a dezoxihipuzin szubsztrát hidroxilálásával. A katalízishez alapvető fontosságú az enzimből található vas, ezért annak kelatálása alkalmas lehet a DOHH működésének gátlására. Munkánkban elsőként kíséreltük meg növényekben a DOHH gátlására használt ciklopirox (CPX) vegyülettel történő kezelést. A növényekre vonatkozó előzetes ismeretek hiányában a CPX-et különböző koncentrációkban alkalmaztuk paradicsom növények két fejlődési állapotában annak kiderítésére, hogy miként hat a paradicsom magok csírázására és a kifejlett növények fejlődésére. A kezelés gátló hatása néhány nap elteltével megmutatkozott a csíranövények hosszának és friss tömegének tekintetében, mely paraméterek koncentrációfüggő módon csökkentek a kontrollhoz képest. A kifejlett növények esetében már a kezelést követő második napon láthatóak voltak az 50 és a 100 μM CPX koncentrációjú közegek toxikus nyomai mind a hajtásokon, mind a gyökereken. A kiválasztott 50 μM CPX kezelést követően kimutatható eltérések jelentek meg a fehérjetartalomban, a szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásban, valamint módosult a szabad poliamin spektrum és a poliaminok lebontása is, ami a hipuzinációhoz esszenciális spermidin elérhetőségét befolyásolja. Eredményeink alapján elmondható, hogy a DOHH gátlására használt CPX kezelés gátolta a különböző életkorú paradicsom növények optimális fejlődését, ám további vizsgálatok szükségesek annak megállapításához, hogy a CPX kezelés mennyire alkalmas a DOHH specifikus gátlására növényekben.

2. Tartalomjegyzék

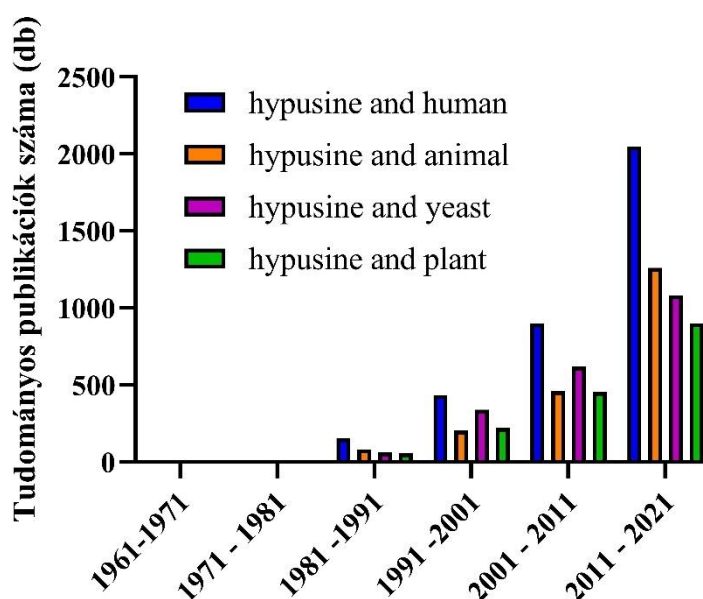
1.	Absztrakt.....	1
2.	Tartalomjegyzék.....	2
3.	Rövidítések.....	3
4.	Bevezetés.....	4
4.1.	Az eukarióta transzlációs faktor 5A (eIF5A)	4
4.1.1.	Az eIF5A és a transzlációban betöltött szerepe.....	4
4.2.	A hipuzin oldallánc kialakulásának jelentősége és folyamata.....	6
4.2.1.	Dezoxihipuzin-szintáz (DHS; EC 2.5.1.46)	7
4.2.2.	Dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH; EC 1.14.99.29).....	8
5.	Célkitűzések	12
6.	Anyagok és módszerek.....	13
6.1.	A vizsgált növényi anyag és nevelési körülményeik.....	13
6.2.	A növények kezelése CPX gátlószerral és a mintavétel menete	13
6.3.	A csírázási paraméterek vizsgálata.....	14
6.4.	A kifejlett növények fejlődési paramétereinek vizsgálata	14
6.5.	A csíranövények gyököcske csúcsainak fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata	14
6.6.	A biokémiai paraméterek vizsgálata	15
6.6.1.	Fehérjetartalom meghatározása	15
6.6.2.	Szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1) enzimaktivitás meghatározása	15
6.6.3.	Klorofilltartalom meghatározása	16
6.6.4.	A DHS és a DOHH, valamint a hipuzin kimutatása western blot analízis segítségével	16
6.6.5.	Szabad poliamin tartalom meghatározása	17
6.6.6.	A poliaminok lebontás enzimeinek (DAO és PAO) aktivitás meghatározása.....	18
6.7.	Statisztikai elemzések.....	18
7.	Eredmények	19
7.1.	A CPX koncentrációfüggésének vizsgálata paradicsom csíranövények fejlődésére.....	19
7.2.	A CPX hatása a csíranövények biokémiai paramétereire.....	19
7.3.	A CPX kezelés hatása a kifejlett paradicsom növények fejlődésére	22
7.4.	A CPX kezelés hatása a kifejlett paradicsom növények biokémiai paramétereire.....	23
7.5.	Felmerült kérdések	28
8.	Összefoglalás	29
9.	Felhasznált irodalom	30
10.	Köszönetnyilvánítás.....	35
11.	Tételes szerzői hozzájárulás.....	36
12.	Nyilatkozat	37

3. Rövidítések

CPX	ciklopirox
DAO	diamin-oxidáz vagy réz amin-oxidáz (EC.1.4.3.22)
DEF	deferipron
DHS	dezoxihipuzin-szintáz (EC 2.5.1.46)
DOHH	dezoxihipuzin-hidroxiláz (EC 1.14.99.29)
eIF5A	eukarióta transzlációs faktor 5A
eRF1	eukarióta release faktor 1
GC7	N ¹ -guanil-1,7-diaminoheptán
PA	poliamin
PAO	poliamin-oxidáz (EC 1.5.3.3)
PPG	prolin-prolin-glicin
PPP	prolin-prolin-prolin
Put	putreszcin
SOD	szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1)
Spd	spermidin
Spm	spermin
DFMO	α -difluoro-metilornitin
ODC	ornitin-dekarboxiláz (EC 4.1.1.17)
ADC	arginin-dekarboxiláz (EC 4.1.1.19)
AIH	agmatin-iminohidroláz (EC 3.5.3.12)
CPA	N-karbamoilputreszcin-amidohidroláz (EC 3.5.1.53)
SPDS	Spd-szintáz (EC 2.5.1.16)
SPMS	Spm-szintáz (EC 2.5.1.16)
SAMDC	SAM-dekarboxiláz (EC 4.1.1.50)
SAM	S-adenozilmetionin
dcSAM	dekarboxilált S-adenozilmetionin
eIF-4D	eukarióta iniciációs faktor 4D
eIF5A (Lys)	eIF5A lizint tartalmazó prekursor formája
eIF5A (Dh)	eIF5A dezoxihipuzint tartalmazó intermediér formája
eIF5A (Hyp)	eIF5A hipuzint tartalmazó aktivált formája

4. Bevezetés

A hipuzináció jelenlegi tudásunk szerint kizárólag az eukarióta transzlációs faktor 5A-t (eIF5A, régebbi nevén eukarióta iniciációs faktor 5A) érintő poszttranszlációs módosítás. Ennek során a fehérje egy konzervált lizinéből két lépésben történik meg a hipuzin [Nε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lizin] aminosav bioszintézise, hogy ezáltal aktiválódjon a transzláció során keletkező prekursor forma (összefoglalva Pálfi és mtsai., 2021). Bár évről évre egyre több publikáció jelenik meg erről az esszenciális folyamatról (1. ábra), továbbra is rengeteg megválaszolatlan kérdés maradt. Kérdésként merülhet fel már az is, hogy miért alakult ki egy olyan folyamat, mely két enzimet is igényel egyetlen fehérje (eIF5A) aktivációjához (Park és Wolff, 2018).



1. ábra: A hipuzin és a különféle élőlények kapcsolatáról fellelhető tudományos publikációk számának változása a Google Scholar tudományos keresőben.

Az 1. ábrán jól látható, hogy bár egyre emelkedik a növények hipuzinációját vizsgáló publikációk száma, messze elmarad az emberi hipuzináció mellett.

4.1. Az eukarióta transzlációs faktor 5A (eIF5A)

4.1.1. Az eIF5A és a transzlációban betöltött szerepe

Felfedezésétől kezdve számos módon hívták a jelenleg eIF5A-ként ismert fehérjét, azonban az egyre több ismeretanyag következtében ma már az eukarióta transzlációs faktor 5A

elnevezés a helyénvaló, habár a hagyományosan elterjedt rövidítés a kezdetben gondolt, iniciációban betöltött szerepére utal (összefoglaló cikk, Park és mtsai., 2018).

Elsőként nyúl retikulocitából került izolálásra az IF-M2B β (Kemper és mtsai., 1976), ami először eIF-4D (eukarióta iniciációs faktor 4D) (Anderson, 1977), majd utána eIF5A neveket kapta (Manchester, 1988). Ezen IF-M2B β , eIF-4D és eIF5A rövidítésekben közös IF betűjelek egy iniciációs faktorra utalnak. A fehérjeszintézis modell vizsgálata során ugyanis azt találták, hogy az eIF5A transzlációs faktor elősegítette metionil-tRNS_f és a puromycin reakcióját, így kezdetben az első peptidkötés kialakításában betöltött szerepére következtettek (Benne és Hershey, 1978). A későbbiekben kimutatták, hogy az eIF5A nem feltétlenül nélkülözhetetlen az általános fehérjeszintézis során, mivel kimerülésével a fehérjeszintézis továbbra is megközelítőleg 70 %-a volt a vad típusú rátának, ezért feltételezték az mRNS-ek csupán kis csoportjának transzlációjához való szükségességét. Ilyen mRNS-ek lehetnek azok, amelyek a DNS-replikációban résztvevő fehérjéket kódolják, ugyanis az eIF5A kimerülése a megnagyobbodott sejteket megállította a sejtciklus G1-es fázisában élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtekben (Kang és Hershey, 1994). Ehhez hasonlóan, az eIF5A faktoron a hipuzin képződésének második lépésének megakadályozása a DOHH enzim gátlására irányuló mimosin alkalmazásával megállást okozott a késői G1-ben LAZ463 sejtvonalon (Epstein-Barr vírussal transzformált humán limfoblasztoid sejtvonala), amiből a sejtciklusban való szabályozó szerepére lehetett következtetni (Hanauske-Abel és mtsai., 1994).

További vizsgálatokkal alátámasztva bebizonyították, hogy az eIF5A a fehérjék transzlációjában nem az iniciáció, hanem az elongáció folyamatában vesz részt (Gregio és mtsai., 2009; Saini és mtsai., 2009). Ebből adódóan Dever és mtsai. (2014) már az eukarióta elongációs faktor 5 (eEF5) elnevezést javasolták, ami aztán nem terjedt el a szakirodalomban. Különösen fontos szerepe van az eIF5A-nak többek között a poliprolin régiók elongációjában, ugyanis hiányában a második vagy harmadik prolinnál a riboszóma megállását tapasztalták (Gutierrez és mtsai., 2013). Az egymást követő prolinok egyike azon aminosav-kombinációknak, melyek megnehezítik a transzláció folyamatát (Schuller és Green, 2018), mivel a peptidkötés kialakítása során a prolin egyrészt gyenge donor (Pavlov és mtsai., 2009), másrészt gyenge akceptor (Wohlgemuth és mtsai., 2008; Doerfel és mtsai., 2013). A poliprolin régiók fontosságát mutatja, hogy az általános prolinhasználat emelkedése nélkül az élőlények komplexitásával együtt a PPP (prolin-prolin-prolin) és PPG (prolin-prolin-glicin) motívumok aránya is megnövekedett. Ezen motívumok gyakoribbá válásával a transzlációjukhoz szükséges eIF5A-nak is szerepe lehet az eukarióták evolúciós fejlődésében (Mandal és mtsai., 2014).

Az eIF5A fehérjének az elongációban betöltött funkciója mellett a terminációban is fontos szerepe van, hiányában a globális termináció hibájára utaló riboszóma felhalmozódást tapasztaltak a stop kodonoknál és a 3' UTR-ben (untranslated region, nem transzlálódó régió). A vizsgálatok alapján az eIF5A serkenti az eRF1 (eukarióta release faktor 1)-mediált peptidil-tRNS hidrolízist (Schuller és mtsai., 2017).

A fent leírtak alapján az eIF5A szerepét nem lehet lekorlátozni kizárólag az iniciációra, elongációra vagy terminációra, ebből adódóan a már említett eukarióta transzlációs faktor 5A elnevezés használata az elfogadott változat.

4.2. A hipuzin oldallánc kialakulásának jelentősége és folyamata

Az eIF5A transzlációjakor egy még inaktív prekursor képződik, mely azáltal aktiválódik, hogy a hipuzin aminosav bioszintézise végbemegy rajta (Park és mtsai., 1997). A hipuzin létezéséről Shiba és mtsai. 1971-ben számoltak be, miután szarvasmarha agyszövetéből sikerült izolálniuk a bázikus aminosavat, amit a szerkezetét felépítő hidroxiputreszcin és lizin alapján neveztek el (Shiba és mtsai., 1971). A hipuzináció esszenciális, amit az eIF5A, a DHS, valamint a többsejtű eukariótákban még a DOHH gének inaktiválásával fellépő letális hatás bizonyít (összefoglaló cikk, Park és mtsai., 2010). A folyamat jelentőségét tovább fokozza, hogy a hipuzinált fehérje konzerváltsága miatt olyan eukarióták között is meg kellett őrződnie ezen poszttranszlációs módosításban érintett géneknek, melyek 900 millió évnnyi evolúciós távolságra vannak egymástól (Gordon és mtsai. 1987). A hipuzin bioszintézisét két enzim is katalizálja, melyek a dezoxihipuzin-szintáz (DHS; EC 2.5.1.46) és dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH; EC 1.14.99.29) (2. ábra).



2. ábra: A hipuzináció két lépése. A dezoxihipuzin-szintáz (DHS) reverzibilisen katalizálja spermidin felhasználásával a prekursor forma [eIF5A (Lys)] intermedier formává [eIF5A (Dh)] alakítását, amiből irreverzibilisen a dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH) hozza létre az aktivált formát [eIF5A (Hyp)].

4.2.1. Deoxihipuzin-szintáz (DHS; EC 2.5.1.46)

4.2.1.1. A DHS katalizálta folyamat

A DHS enzim katalizálja a hipuzin bioszintézis első, reverzibilis lépését, ami maga is többlépéses reakcióra bontható, lejátszódásához pedig spermidin (Spd) és eIF5A(Lys) szubtrátokat, valamint NAD kofaktort igényel (Wolff és mtsai., 1990). A tetramer DHS enzimet négy azonos, 222 szimmetriával kapcsolódó alegység épít fel, melyek két szorosan kapcsolódó dimert, a A1A2-t és a B1B2-t alkotnak. Mindkét dimer a határfelületükön 2-2 aktív helyet tartalmaz, vagyis összesen 4 darabot. Az aktív helyek katalitikus és NAD-kötőhelye külön alegységen találhatóak (Liao és mtsai., 1998). A Spd NAD^+ -függő dehidrogenálása során dehidrospermidinné alakul, miközben NADH képződik (Wolff és mtsai., 1990). A dehidrospermidin 4-aminobutil csoportja 1,3-diaminopropán felszabadulása mellett a DHS enzim specifikus lizinjének (emberben Lys^{329}) ϵ -aminocsoportjára kerül enzim(Lys)-imin intermediert formálva (Wolff és mtsai., 1997). eIF5A hiányában is képes eddig a reakció lezajlani, ekkor 1,3-diaminopropán és Δ^1 -pirrolin termelődik (Wolff és mtsai., 1990), eIF5A jelenlétében viszont az enzim(Lys)-imin intermedierről a 4-aminobutil csoport a prekursor transzlációs faktor specifikus lizin-maradékára kerül eIF5A-imin intermediert eredményezve (Wolff és mtsai., 1997). Végül a Spd oxidációjakor keletkező NADH redukálja az eIF5A-imin intermediert, hogy létrehozza a deoxihipuzin [N ϵ -(4-aminobutil)-lizin] oldalláncot tartalmazó fehérjét, ami ekkor még szintén intermedier forma (Wolff és mtsai., 2000).

4.2.1.2. Lehetőségek a DHS farmakológiai gátlására

A DHS gátlásához felhasználhatóak annak Spd szubsztrátjával rokon vegyületek, melyek közül a kompetitív hatású GC7 (N¹-guanil-1,7-diaminoheptán) bizonyult a leghatékonyabbnak (K_i 9.7 ± 0.50 nM) a vizsgálatok során (Jakus és mtsai., 1993). További lehetőséget nyújtanak a CNI-1493 (semapimod), a deoxispergualin (gusperimus), és a DHSI-15 gátlószerek (összefoglaló cikk, Turpaev, 2018).

4.2.1.3. A poliaminok szerepe a hipuzinációban

A hipuzin oldallánc kialakításában prekursor szerepű a poliaminok (PA) közé sorolható Spd (Park és mtsai., 1981). PA auxotróf sarjadzó élesztő mutánsokban megfigyelték, hogy a Spd alacsony koncentrációja (10^{-8} M) már elegendő a vad típushoz hasonló növekedés eléréséhez, viszont intracelluláris koncentrációja töredéke a vad típuséhoz képest. Az

intracelluláris Spd mennyiségének korlátozottá válásával szembevetendő az is, hogy egyre nagyobb arányban használódik fel az eIF5A hipuzinációjára, ezzel alátámasztva a Spd kitüntetett szerepét ezen poszttranszlációs módosításban. Bizonyították azt is, hogy az eIF5A teljes mennyisége bár nem különbözik a mutáns és a vad típusú sejtekben, előbbiekben a prekursor forma magasabb arányban van jelen (Chattopadhyay és mtsai., 2008).

A PA-ok esszenciálisak a sejtek növekedésében és differenciációjában, amelyhez intracelluláris szintjüket számos mechanizmus szabályozza kihatva a szintézisükre, lebontásukra, felvételükre és kiválasztásukra (Urdiales és mtsai., 2001; Alcázar és mtsai., 2020).

A PA-ok bioszintéziséhez a Put (putreszcín) képződhet direkt úton az ODC (ornitin-dekarboxiláz, EC 4.1.1.17) katalizálta ornitin dekarboxilációval, és/vagy indirekt módon az ADC (arginin-dekarboxiláz, EC 4.1.1.19) általi arginin dekarboxilációval, amihez további két egymást követő lépésben az AIH (agmatin-iminohidroláz, EC 3.5.3.12) és a CPA (N-karbamoilputreszcín-amidohidroláz, EC 3.5.1.53) működik közre. Érdekes módon, habár az ODC útvonalat hagyományosan univerzálisnak tekintették, Arabidopsisban kizárólag az ADC útvonalon keresztül képződik Put. A Put szolgál prekuzorként a Spd és Spm (spermin) kialakításához, melyben az SPDS (Spd-szintáz, EC 2.5.1.16) és az SPMS (Spm-szintáz, EC 2.5.1.16) enzimek vesznek részt, a reakcióhoz szükséges aminopropil csoportok pedig a SAMDC (SAM-dekarboxiláz, EC 4.1.1.50) segítségével a SAM (S-adenozilmetionin) dekarboxilálásával létrehozott dcSAM-ról (dekarboxilált S-adenozilmetionin) származnak (összefoglaló cikk, Alcázar és mtsai., 2010).

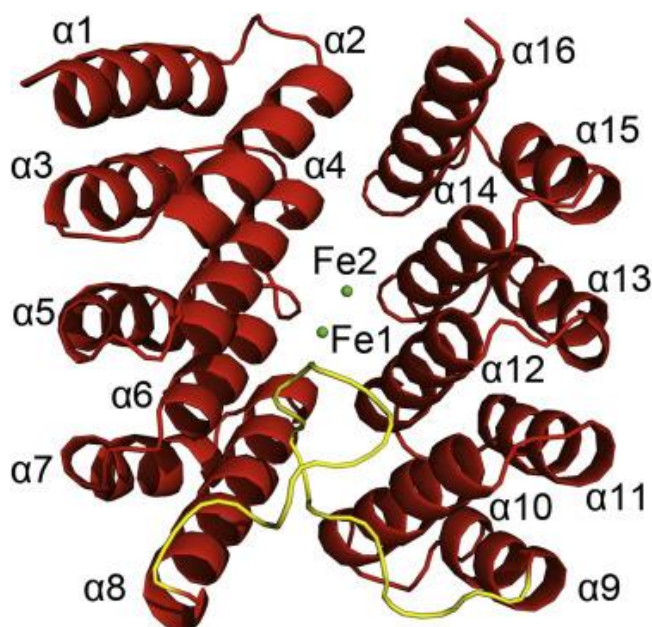
A PA-ok lebontását a réztartalmú DAO (diamin-oxidáz, EC 1.4.3.6) és a FAD (Flavin-adenin-dinukleotid)-molekulát hordozó PAO (poliamin-oxidáz; EC 1.5.3.3) enzimek végzik, a katalizált reakciók termékei között a H_2O_2 is megtalálható (Alcázar és mtsai., 2010).

A hipuzinációra a Spd függése miatt a PA-ok metabolizmusának befolyásolásával is hatás gyakorolható. Kísérlettel is igazolták, hogy DFMO-val (α -difluoro-metilornitin) farmakológiailag gátolt ODC egér emlőrák FM3A sejtekben a PA-k és hipuzinált eIF5A csökkenését eredményezte (Nishimura és mtsai., 2005).

4.2.2. Dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH; EC 1.14.99.29)

A hipuzináció második irreverzibilis lépését katalizáló DOHH alakítja ki az intermedier eIF5A dezoxihipuzin oldalláncának hidroxilálásával a hipuzin tartalmú aktív transzlációs faktort (Abbruzzese és mtsai., 1986). Az enzim génje erősen konzervált, az élesztőtől az

emberig számos eukariótában megtalálható. A szekvencia-illesztés vizsgálatok már prediktálták, hogy az enzim 8 darab HEAT ismétlődést tartalmaz, melyek elnyújtott hurokkal összekötött N- és C-terminális domének között oszlanak meg (Park és mtsai., 2006). A HEAT motívumot felépítő α -hélixek közül a páratlan sorszámúak az enzim külső részén, míg a páros sorszámúak a belső felén helyezkednek el. Az egymás alatt elhelyezkedő 4, 6 és 12, 14 α -hélixek között található a hDOHH nemhem divas-tartalmú aktív centruma (Han és mtsai., 2015) (3. ábra).



3. ábra: A humán dezoxihipuzin-hidroxiláz (hDOHH) szerkezeti felépítése. A HEAT motívumokat alkotó kettős α -hélixek vörössel, az N- és C-terminális domén közötti hurok sárgával, a vasatomok zölddel lettek jelölve (Han és mtsai., 2015).

A hDOHH katalitikus mechanizmusát egyelőre még nem ismerjük pontosan, azonban ennek megismerésére irányuló elméleti tanulmányt jelentetett meg Wang és mtsai. 2020-ban. Számításaik alapján a szubsztrát kötődése az aktív központ peroxo izomerizációját váltja ki, majd az O-O kötés felhasadásával $[\text{Fe}^{\text{IV}}_2(\mu\text{-O})_2]^{4+}$ képződik, végül a szubsztráttól a H atomot elvonja, és a helyére OH csoportot köt vissza.

A humán sejtekben a DOHH erősebb kötődését tapasztalták a dezoxihipuzin tartalmú eIF5A-hoz, mint a prekursor, illetve a hipuzinált formához. Az eIF5A és a DOHH közötti kötés kialakításához és a hipuzinációs módosítás létrejöttéhez a dezoxihipuzin nem elegendő, azt ugyanis az enzim nem képes szabad aminosavként hidroxilálni. Továbbá az enzim több konzervált aminosavmaradványa is fontos, melyek alanin szubsztitúcióval akár teljesen megakadályozhatták a kötődés kialakulását és az aktivitást (Kang és mtsai., 2007).

4.2.2.1. A DOHH enzim működésének szabályozására használt módszerek

A DOHH funkciójának megismeréséhez különböző megközelítéseket alkalmaztak, így a vizsgálatok során olyan organizmusok kerültek elő, melyekben az enzim génje mutációt hordozott, génkiütést végeztek, RNS interferenciával csendesítették a génexpressziót, vagy éppen overexpressziót idéztek elő, de akad példa a fehérje farmakológiai gátlószereire, továbbá aktivátoraira is.

A sarjadzó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) DOHH enzimét egyetlen gén kódolja, ezért homozigóta kiütésével az eIF5A fehérje egyedül a dezoxihipuzin formáig tud módosulni. A dezoxihipuzinált eIF5A azonban valószínűleg képes a teljesen hipuzinált fehérje szerepét elvégezni sarjadzó élesztők esetében, hiszen a DOHH-null vonal növekedése csak kissé marad el a szülői vonalhoz képest (Park és mtsai., 2006). Érdekes módon a sarjadzó élesztőkkel szemben a hasadó élesztőkben (*Schizosaccharomyces pombe*) látszólag fontosabb szerepe van az Mmd1 kódolta DOHH homológ génnek, ugyanis mutációjukkal hőmérséklet-érzékeny növekedését, valamint a mitokondriumok morfológiájának és eloszlásának defektjét tapasztalták (Weir és Yaffe, 2004). Többsejtű szervezetekben a DOHH jelenléte már esszenciális jelentőségű, hiányuk letális hatását többek között bizonyították az ecetmuslica (Patel és mtsai., 2009), illetve egér 3T3 fibroblaszt sejtvonal sejtekben (Sievert és mtsai., 2014). Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) DOHH homológja a *nero*, mutáns változatának vizsgálatakor kisebb méretű sejteket és szerveket, a sejtciklus menetének késésére utaló csökkent bróm-dezoxiuridin beépülést, továbbá az autofágiára gyakorolt hatását figyelték meg (Patel és mtsai., 2009). RNS interferenciával, valamint farmakológiai gátlószerek (ciklopirox [CPX], deferipron [DEF]) alkalmazásával HeLa méhnyakrák és U2OS oszteosarkóma sejteken is tapasztalták a DOHH proliferációban betöltött szerepét, amikor a kezelések a kontrollhoz képest csökkent sejtszámot eredményeztek. A gátlószerekkel kezelt méhnyakrák sejteknél továbbá megfigyelték a G1-S fázis közötti megállást és az eIF5A hiányos élesztő fenotípusára (Kang és Hershey, 1994) emlékeztető megnagyobbodott méretet (Mémin és mtsai., 2014). A DOHH gátlószereinek esetleges klinikai felhasználása azonban nemcsak a rákellenes terápiákra korlátozódhat. A HIV-1 replikációjához szükséges az eIF5A, így annak aktiválásához szükséges DOHH CPX és DEF használatával történő gátlásával a vírus replikációja is gátlás alá került (Hoque és mtsai., 2009). A maláriaellenes szerek kutatása során *Plasmodium falciparum* DOHH enzimével szemben is kedvező hatásúnak találtak több vaskelatáló vegyületet (von Koschitzky és mtsai., 2015).

A DOHH gátlása mellett érdemes megjegyezni, hogy az enzim aktiválására is irányultak kutatások. Az idei évben jelent meg egy cikk a természetes kis molekula brazilinról, ami a DOHH allosztérikus aktiválásával véd az iszkémiás sérüléstől azáltal, hogy fokozza a mitofágiát a mitokondriális funkció és morfológia fenntartásának érdekében (Guo és mtsai., 2022). A növénytermesztés számára pedig a növénypatogén *Fusarium graminearum* DOHH overexpresszáltatásakor kapott eredmény tűnik ígéretesnek, mivel a gomba patogenitásának gátlását idézték elő kukoricában és búzában, hozzájárulva a gomba megemelkedett ROS termelődéséhez és a csökkent mikotoxin, a dezoxinivalenol produkciójához (Martinez-Rocha és mtsai., 2016).

4.2.2.2. Lehetőségek a DOHH farmakológiai gátlására

A DOHH gátlására az aktív centrumban található vas részecskéket célzó kelátképző molekulák használhatóak (4. ábra). Ilyen koncentrációtól függő gátlók a CPX, a DEF, a deferoxamin, a mimozin és a 2,2'-dipiridil, melyek közül a CPX bizonyult a leghatékonyabbnak (IC_{50} 5 μ M HUVEC [humán köldökvénás endotélsejtek]) a hipuzin bioszintézisének gátlásában (Clement és mtsai., 2002). Fontos megjegyezni, hogy a növényi DOHH vizsgálatára farmakológiai módszerekkel még ezidáig nem került sor.



4. ábra: A hipuzináció második lépésének farmakológiai gátlása ciklopirox (CPX) használatával. A CPX vaskelatólő hatása következtében képes a dezoxihipuzin-hidroxiláz (DOHH) enzim gátlására, ezáltal akadályozva az eIF5A aktivált formájának [eIF5A (Hyp)] kialakítását.

5. Célkitűzések

Kutatócsoportunkban célul tűztük ki, hogy az esszenciális jelentőségű poszttranszlációs hipuzin módosítás mechanizmusait feltérképezzük növényekben, ugyanis a viszonylag kevés rájuk irányuló kutatás számos kérdést hagyott még megválaszolatlanul.

Dolgozatom elkészítéséhez a paradicsom növények (*Solanum lycopersicum*) CPX farmakológiai gátlószerezrel történő kezelésének vizsgálatát tűztem ki, hogy megválaszolhassam a következő kérdéseket:

- Az állati rendszerekben használt CPX alkalmazható-e növényi szervezeteken is a hipuzináció folyamatának vizsgálatára anélkül, hogy toxikus hatást kifejtve ellehetetlenítené a különféle méréseket?
- Alkalmazhatóság esetén milyen koncentrációban lenne célszerű alkalmazni a CPX-t a növények számára, hogy a kontrolhoz képest már megfigyelhető eltéréseket tapasztaljunk az egyes paraméterek vizsgálatakor?
- A CPX kezelés egyáltalán milyen hatást gyakorol a paradicsom növényekre, különböző fejlődési stádiumok esetében megfigyelhető-e bármilyen fejlettségtől függő eltérés és ténylegesen képes-e a DOHH gátlásán keresztül csökkenteni a hipuzin bioszintézisének mértékét?
- A hipuzin bioszintézisének Spd-függéséből következik-e, hogy a hipuzináció gátlására irányuló CPX kezelés megváltoztatja-e a Spd, illetve rajta keresztül a többi PA metabolizmusát is paradicsom növényekben?

6. Anyagok és módszerek

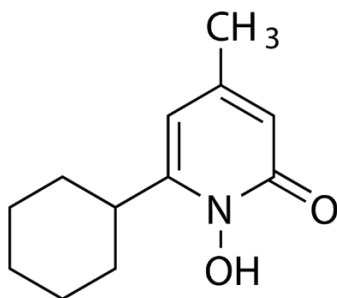
6.1. A vizsgált növényi anyag és nevelési körülményeik

Kísérleteinket paradicsom növényeken (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) végeztük csíranövény, illetve kifejlett, vegetatív stádiumokban (4 hetes növény). A csíranövényes vizsgálatok során a paradicsom magokat már kezdettől fogva a CPX tartalmú környezetbe helyeztük, így a CPX kezelés szűrőpapíron, 9 cm-es kör alakú petri csészében, 72 órán át, sötétben, 27 °C-on történt.

A kifejlett növények vizsgálatához előnevelés volt szükséges, ami Szepesi és mtsai. (2009b) által leírt módon történt. A paradicsom magokat egy órán át csapvízben áztattuk, majd nedves szűrőpapíron csíráztattuk őket 3 napig 27 °C-re állított sötét termosztátban. A csíranövények a növénynevelőbe kerültek át, ahol kontrollált üvegházi körülmények között fejlődhettek. A 12 óra sötétséget 12 óra megvilágítás követte naponta, a fényintenzitás (Master HPI-T Plus fénycsövek, Philips, Belgium) 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ volt. Az átlagos hőmérséklet megközelítőleg nappal 24 °C, míg éjszaka 22 °C volt, a relatív páratartalom pedig 55 és 60 % körüli volt. Miután 1 hétig erősödtek a palánták a perlitben, a növényeket tápoldatba helyeztük át, azt pedig heti 3 alkalommal cseréltük alattuk egészen 4 hetes korukig, amikor CPX kezelést kaptak a tápoldatba keverve a gyökéren keresztül. A tápoldat a következőket tartalmazta: 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1 mM MgSO_4 ; 0,5 mM KCl ; 0,5 mM KH_2PO_4 ; 0,5 mM Na_2HPO_4 ; 0,001 mM MnSO_4 ; 0,005 mM ZnSO_4 ; 0,0001 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; 0,01 mM H_3BO_3 ; 0,02 mM $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA), a tápoldat pH-ja 6.0 körüli volt.

6.2. A növények kezelése CPX gátlószerral és a mintavétel menete

A ciklopirox (6-ciklohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridon, CPX, Sigma-Aldrich) a hipuzináció második lépését katalizáló enzim, a DOHH működését gátolja (5. ábra).



5. ábra: A ciklopirox (CPX) szerkezeti képlete (forrás: Sigma-Aldrich oldala)

Az előzetes kísérletek során a gátlószert mind a csíranövények, mind a kifejlett növények esetében 2, 10, 50, 100 μM koncentrációban alkalmaztuk, majd a további vizsgálatokhoz a kiválasztott 50 μM -os kezelést használtuk. A csíranövények esetében a kezelés a szűrőpapíron történt 72 órán keresztül, a kifejlett növényeknél viszont a tápoldathoz adagoltuk a gátlószert, melyben egy napig történt a kezelés.

A kezelést követően a mintavétel során a csíranövényeket petri csészénként csomagoltuk külön, a kifejlett növények esetében a gyökérzetet, valamint a 2. kifejlett levélemelet levéllemezeit használtuk fel. A biokémiai paraméterek lemeréséig a fagyasztóban, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mintákat.

6.3. A csírázási paraméterek vizsgálata

A csíranövényeket mintavételig minden nap lefényképeztük (Canon EOS 700D, Canon, Ota City, Tokió, Japán), a fotókról meghatároztuk a csíranövények hosszát ImageJ v1.33 szoftverrel (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Azokat a magokat tekintettük kicsírázottknak, amelyeknél a csíranövények elérték az 1 mm-t. A kapott adatokból meghatároztuk a csírázási százalékokat. A 4. napon, a mintavétel során a csíranövények friss tömegei is lemerésre kerültek petri csészénként. A csíranövények gyököcskéinek gyökérszőrőiről sztereomikroszkóp (Zeiss Stemi 305 trino, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével fotókat készítettünk.

6.4. A kifejlett növények fejlődési paramétereinek vizsgálata

A kezelést követően a növények hajtásainak és gyökereinek meghatároztuk a hosszát (cm), valamint a friss tömegét (g), annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a gátlószerek egymáshoz, illetve a kontrollhoz képest kifejtett hatását.

6.5. A csíranövények gyököcske csúcsainak fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata

A H_2O_2 tartalom megjelenítésére Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin, AR) festéket használtunk Lehotai és mtsai. (2012) módszerét követve. A festék törzsoldatát 10 mM koncentrációban DMSO alkalmazásával állítottuk elő. A csíranövényeket sötétben és szobahőmérsékleten 30 percre az 50 μM koncentrációjú festékoldatba helyeztük, amit 50 mM pH 7,5 Na-foszfát puffer (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) felhasználásával készítettük el. A festést követően a mikroszkópos vizsgálat előtt elvégeztük a gyököcskék egy egyszeri, 5 perces

mosását, Na-foszfát pufferben. A gyököcske csúcsok H₂O₂ tartalmát a festést követően Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével vizsgáltuk annak fluoreszcens üzemmódjában. Az excitáció hullámhosszát $\lambda=540$ nm-re állítottuk be, az emisszió 590 nm-en történt, a vizsgálathoz 20 Rhodamine szűrőt alkalmaztunk. Az expozíciós idő 353,7 ms volt, a vizsgálatokat pedig 10x nagyítású objektívvel végeztük. A mintáinkat nagy felbontású, digitális kamerával (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) fotóztuk.

A O₂⁻ tartalom megjelenítésére dihidroetídium (DHE) festést alkalmaztunk Kolbert és mtsai. (2012) leírása alapján. A csíranövényeket sötét szobában 30 percig inkubáltuk 10 μ M-os DHE-oldatban tartva, mely elkészítéséhez 5 mM-os DMSO-ban oldott DHE festéktörzsoldatot, valamint 10 mM pH 7,4 Tris-HCl puffert használtunk. A mikroszkópos vizsgálat előtt a csíranövényeket kétszer 5 percig mostuk Tris-HCl pufferrel. A festések előhívásához a fluoreszcens mikroszkóp és a kamera beállításait az Amplex Red festéshez képest nem változtattuk.

A minták fluoreszcens festéséről készített képek pixelintenzitásának a kiértékelését Axiovision Rel. 4.8 szoftver segítségével végeztük.

6.6. A biokémiai paraméterek vizsgálata

6.6.1. Fehérjetartalom meghatározása

A növényi minták fehérjéinek mennyiségi meghatározását Bradford és mtsai. (1976) által leírt módszert követve végeztük el. A csíranövények esetében 200-250 mg, a kifejlett növények hajtásából és gyökeréből közel 100-100 mg növényi anyag került homogenizálásra pH 7,0 50 mM foszfát pufferben (KH₂PO₄, Na₂HPO₄). Az eldörzsölt homogenizátumot 10 percig centrifugáltattuk (12 000 rpm 4 °C) Eppendorf centrifugával (Eppendorf 5424R, Eppendorf GMBH, Németország). A felülúszót enzimkivonatként használtuk a reakcióelegy összeállításához, ami 900 μ l tisztított vizet, 5 μ l enzimkivonatot és 100 μ l Bradford reagenst tartalmazott. 96-lyukú plate-re a reakcióelegyekből 200-200 μ l térfogatokat mértünk ki, melyek optikai denzitásait Synergy HTX plate reader-rel (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) állapítottuk meg 595 nm-en. A kapott értékeket friss tömegre vonatkoztattuk.

6.6.2. Szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1) enzimaktivitás meghatározása

A SOD enzimaktivitást Szepesi (2009a) módszerét felhasználva állapítottuk meg a fehérjetartalom mérésekor készített enzimkivonatokból. A reakcióelegy összetétele a következő

volt: 900 µl 50 mM foszfát puffer (pH 7.0, 13 mM L-metionin); 33 µl enzimkivonat; 33 µl 5 mM NBT; 33 µl 0,2 mM riboflavin-oldat. Egy párhuzamost sötétben tartottunk, míg 3 elegy került 18 W-os LED fénycső (Energetic T8-18W-65S, PRC) alá, 10 percen keresztül. A fényérzékeny riboflavin megvilágítás hatására bomlik, az ennek hatására felszabaduló $O_2^{\cdot-}$ -ok pedig redukálják az NBT-t kék csapadék, a formazán képződése mellett. A formazán emeli a reakcióelegyek optikai denzitását 560 nm-en, ezt azonban a SOD képes gátolni. Ennek alapján a SOD egy enzimegysége definiálható az NBT redukciójának 50 %-os gátlaként (Cheng és mtsai., 2015). A reakcióelegyek optikai denzitását Synergy HTX plate reader segítségével (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) határoztuk meg 560 nm-en.

6.6.3. Klorofilltartalom meghatározása

A levelek pigmenttartalmát Faragó és mtsai. (2018) munkája alapján mértük. A mintákat 1,5 ml 95 %-os etanolban dörzsöltünk el, majd a homogenizátumokat 10 percig centrifugáltuk Eppendorf centrifugával (Eppendorf 5424R, Eppendorf GMBH, Németország) 12 000 rpm, 4 °C. A felülúszók optikai denzitását Synergy HTX plate reader segítségével (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) vizsgáltuk 664, 648 és 470 nm-es hullámhosszokon.

A pigmenttartalmakat a következő képletek felhasználásával számoltuk ki:

$$\text{Klorofill-a } (\mu\text{g/ml}) = 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{648}$$

$$\text{Klorofill-b } (\mu\text{g/ml}) = 27,43 \cdot A_{648} - 8,12 \cdot A_{664}$$

$$\text{Összes klorofill } (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

Az eredményeket friss tömegre vonatkoztatva számoltuk ki.

6.6.4. A DHS és a DOHH, valamint a hipuzin kimutatása western blot analízis segítségével

A növényi protein kivonatot 150 mg növényi minta felhasználásával végeztük. A mintákat extrakciós puffer hozzáadásával homogenizáltuk (50 mM Tris-HCl puffer pH 7,6-7,8, kiegészítve 0,1 mM EDTA, 0,1 (v/v) % Triton-X-100, 10 (v/v) % glicerol), majd 10 000 rpm-en 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk (Eppendorf 5424R, Eppendorf GMBH, Németország). A felülúszót használtuk a natív és a denaturáló gélelektroforézishez. A minták fehérjetartalmát Bradford (1976) módszerével határoztuk meg kontrollként borjú szérum albumint használva.

A western blot analízis során 7,5 µg fehérjét tartalmazó csíranövény és hajtás, valamint gyökérkivonatot használtunk és 12 (w/v) %-os denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisnek

vetettük alá. Az ilyen módon elválasztott fehérjét az akrilamid gélből tank transzfer segítségével transzfereltük PVDF membránra (16 h, 25 mA) Oláh és mtsai. (2020) alapján. Az így kapott PVDF membránokat használtuk a DHS és DOHH enzimek és a hipuzin kimutatására.

A DHS esetében, először blokkoltuk 5 (w/v) %-os tejfehérje oldattal, mely TBST pufferben készült (20 mM Tris, 178 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH7.8), a nem specifikus antitest kötés elkerülése érdekében, majd 1:2000 arányban hígított nyúl anti-DHS antitesttel (Sigma-Aldrich, katalógusszám: HPA014461) jelöltük őket.

A DOHH esetében, először blokkoltuk 5 (w/v) %-os tejfehérje oldattal, mely TBST pufferben készült (20 mM Tris, 178 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, pH7.8), a nem specifikus antitest kötés elkerülése érdekében, majd 1:2000 arányban hígított nyúl anti-DOHH antitesttel (Sigma-Aldrich, katalógusszám: HPA041953) jelöltük őket.

A hipuzin esetében, először blokkoltuk 5 (w/v) %-os tejfehérje oldattal, mely TBST pufferben készült (20 mM Tris, 178 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, pH7.8), a nem specifikus antitest kötés elkerülése érdekében, majd 1:2000 arányban hígított nyúl anti-hipuzin antitesttel (Sigma-Aldrich, katalógusszám: ABS1064-I) jelöltük őket.

Három mosási lépés következett, majd 1:10000 arányban hígított kecske nyúl IgG elleni antitestet (Sigma-Aldrich, katalógusszám: A3687) alkalmaztunk, mely alkalikus foszfátot hordozott a detektáláshoz. A fehérjét a BCPIP/NBT reakcióval tettük láthatóvá, ahol az antitesttel jelölt fehérjéknél fekete színű formázán keletkezett. A membránokat aktin antitesttel is jelöltük loading kontrollként (Agrisera, AS13 2640).

6.6.5. Szabad poliamin tartalom meghatározása

A PA-kat Szepesi és mtsai. (2022) által leírt protokoll szerint határoztuk meg. A növényi szöveteket 700 µl 5%-os perklórsavban homogenizáltuk 0 °C-on dörzsmozárban. Vortexelés után a mintákat centrifugáltuk (4 °C, 20 perc, 12 000 rpm) Eppendorf 5424R centrifugával, ezt követően a felülúszó 500 µl-éhez 400 µl 2 M NaOH-t adtunk a megfelelő pH eléréséhez. A származékképzés 10 µl benzoil-kloriddal történt. A benzoil-poliaminokat dietil-éterrel extraháltuk. A szerves fázist szárazra pároltuk. A szabad PA-k származékainak analíziséhez izokratikus elválasztást használtunk 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. UV detektor segítségével 254 nm-en detektáltuk a csúcsokat, amelyeket Put, Spd és Spm standard minták segítségével azonosítottunk. A minták PA koncentrációit kalibrációs egyenes segítségével, a csúcs alatti területből számoltuk, majd a friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

6.6.6. A poliaminok lebontás enzimeinek (DAO és PAO) aktivitás meghatározása

A DAO és PAO enzimaktivitások vizsgálatát Moschou és mtsai. 2008-ban leírt módszere alapján végeztük el. A meghatározáshoz a növényi anyagokat folyékony nitrogénben porrá dörzsöltük. Ezt 600 µl protein extrakciós pufferrel kevertük el, melynek összetétele a következő volt: 1 M pH 8-ra állított TRIS, 50% glicerol, 20% Triton X-100, 100 mM PMSF. A mintákat 20 percen keresztül tartottuk jégen, majd 10 percig centrifugáltuk Eppendorf centrifugával (12 000 rpm, 4 °C). A visszamaradt felülúszókból 150-150 µl-t pipettáztunk ki két eppendorf cső sorozatba a két enzim külön vizsgálatához. A csövekben lévő mintákhoz 600 µl mennyiségű 100 mM 6,6-os pH-értékű nátrium-foszfát (Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4) puffert és 7,5 µl 1 M-os PA-t (a DAO esetén 1 M Put, míg a PAO esetében 1 M Spd) adtunk. Az összeállított reakcióelegyeket 1,5 órán át inkubáltuk 37 °C-on, így optimális körülmények között zajlott a PA-k lebontása. A szubsztrátok lebontását 48,75 µl 20 %-os TCA-val állítottuk meg, majd az addig keletkezett Δ^1 -pirrolin molekulákat 22,5 µl 10 mg/ml koncentrációjú etanolban oldott 2-aminobenzaldehiddel reagáltattuk el. 30 percre jégre tettük a mintáinkat, ezután a centrifugálás ismétlése következett az elsővel megegyező paraméterek mellett. A színreakció során a Δ^1 -pirrolin és a 2-aminobenzaldehid egymáshoz kötődött molekulák mennyiségétől függően eltérő optikai denzitású elegyeket kaptunk, amik így közvetve az enzimek aktivitására utaltak, ahol egy egysége a percenként 1 µmol PA oxidálásához szükséges enzim mennyiséget jelöli. Fényelnyelés mértékét Synergy HTX plate reader-t (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) alkalmazva 430 nm-en határoztuk meg.

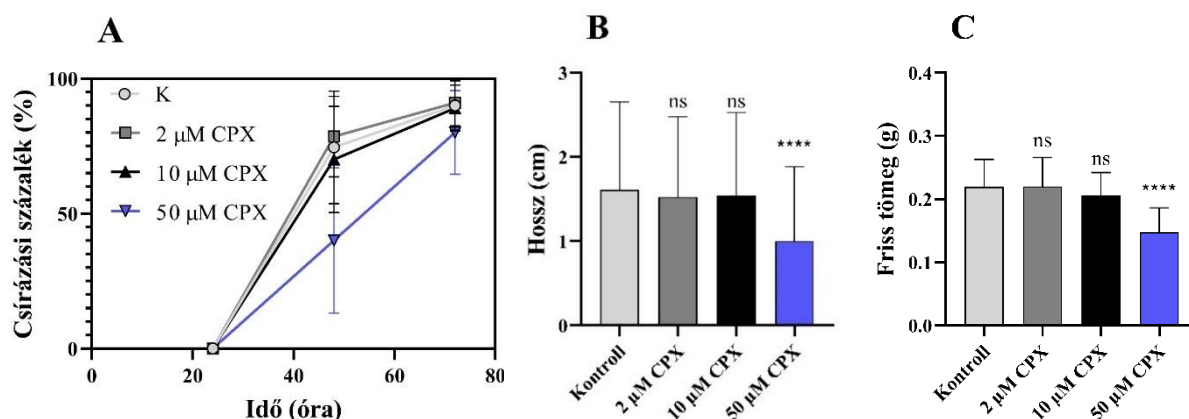
6.7. Statisztikai elemzések

A kísérleteinket több ismétléssel (2-3), valamint párhuzamossal (n=3-20) végeztük el. Az adatok kiértékeléséhez és a diagramok ábrázolásához GraphPad Prism version 8.0.1.244 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) szoftvert alkalmaztunk. A diagramokon feltüntettük az átlagot és a szórást. A statisztikai értékelésnél a Student-féle t tesztet alkalmaztuk a kontroll és a CPX kezelések összehasonlítására, ahol a jelölések a következők voltak: ns(nem szignifikáns), *($P \leq 0.05$); **($P \leq 0.01$); ***($P \leq 0.001$); ****($P \leq 0.0001$).

7. Eredmények

7.1. A CPX koncentrációfüggésének vizsgálata paradicsom csíranövények fejlődésére

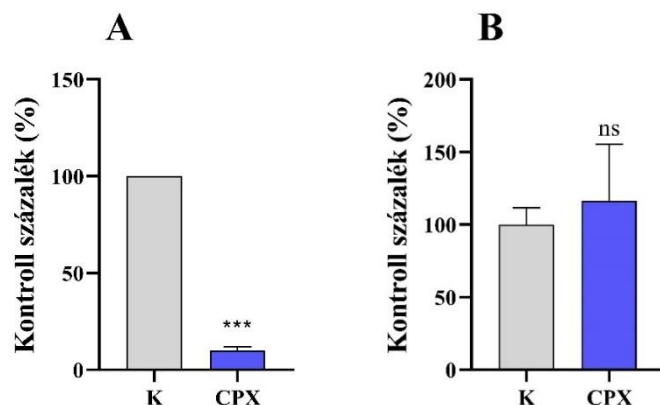
Előzetes vizsgálataink során összehasonlítottuk a CPX különböző koncentrációinak a paradicsom csíranövények fejlődésére gyakorolt hatását. Mivel a növényekben még nem állt rendelkezésre információ a CPX kezelésről, így az állati rendszerekben használt koncentrációkat alkalmaztuk. A csírázási százalék alapján elmondható, hogy a kiválasztott CPX 50 μ M-ban alkalmazva késleltette a csírázást a kontrollhoz képest (6. ábra A), valamint a 72 órás kezelést követően a csíranövények hosszában (6. ábra B) és a friss tömegében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést (6. ábra C).



6. ábra: A csírázási paraméterek változása a ciklopirox (CPX) koncentrációjának függvényében. A tesztelés során kontroll (K) és eltérő CPX (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) koncentrációjú kezelésnek kitett paradicsom csíranövények (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) **(A)** csírázási százalékát, **(B)** hosszát, illetve **(C)** friss tömegét hasonlítottuk össze. $n = 15$, az átlagok $\pm$ SD, t-próba.

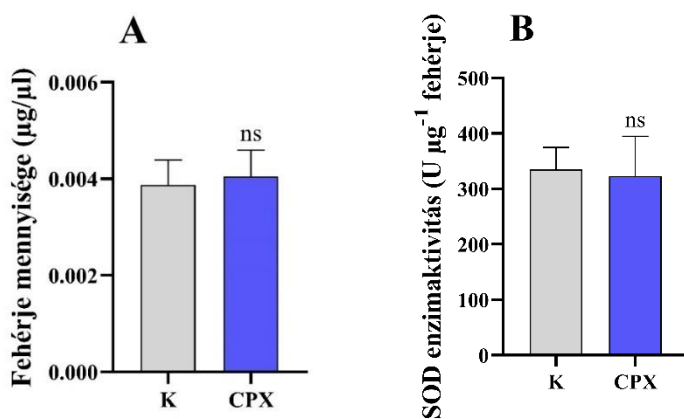
7.2. A CPX hatása a csíranövények biokémiai paramétereire

A csíranövények gyököcskéit fluoreszcens festéssel vizsgálva kimutatható volt, hogy a CPX kezelt csíranövények H_2O_2 szintje jelentősen csökkent a kontrollhoz képest, míg a szuperoxid gyökéanion tartalomban nem volt szignifikáns eltérés (7. ábra).



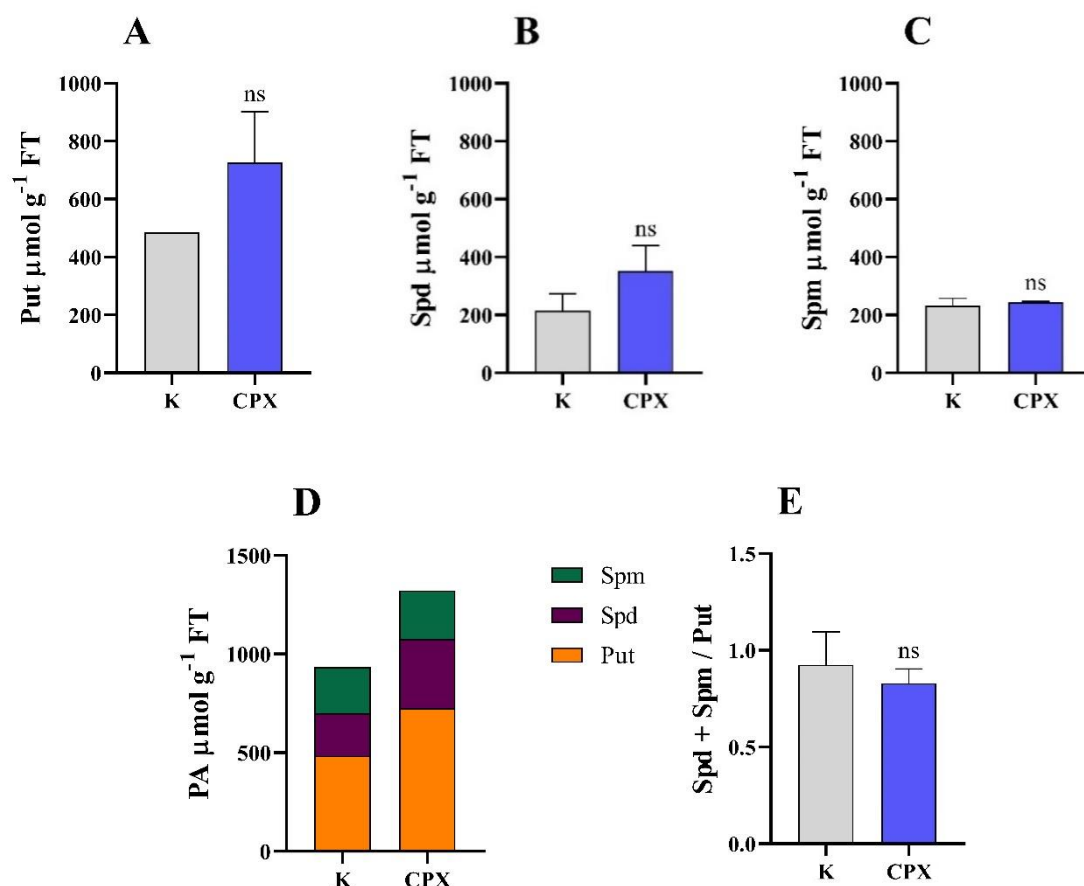
7. ábra: A csíranövények hidrogén-peroxid (H_2O_2) és szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$) tartalmának összehasonlítása fluoreszcens festésekkel. A kontroll (K), illetve az 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett paradicsom csíranövényeken (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) **(A)** Amplex Red (H_2O_2), illetve **(B)** dihidroetídium ($O_2^{\cdot-}$) fluoreszcens festéseket végeztünk. A fluoreszcens jel számszerűsített intenzitásából számolt kontroll százalék került ábrázolásra. $n = 6$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

A CPX kezelés nem okozott jelentős eltérést a fehérje mennyiségében és a SOD enzim aktivitásában (8. ábra).



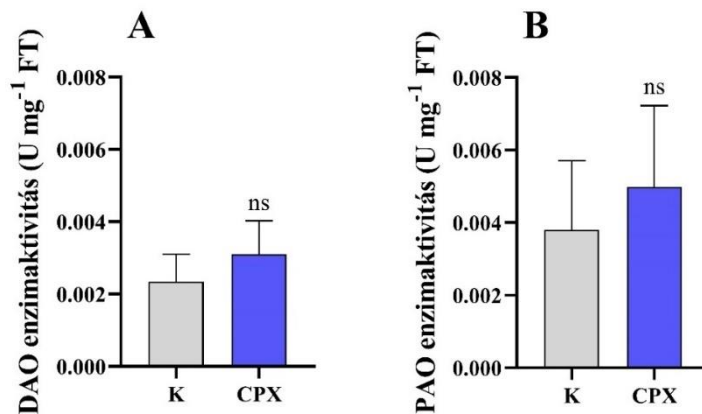
8. ábra: A fehérjék mennyisége, illetve a szuperoxid-dizmutáz (SOD; EC 1.15.1.1) enzimaktivitása csíranövényekben. A kontroll (K), illetve az 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett paradicsom csíranövényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük azok **(A)** fehérje tartalmát, illetve **(B)** szuperoxid-dizmutáz (SOD; EC 1.15.1.1) enzimaktivitását. $n = 12$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

A szabad PA spektrum vizsgálatakor sem az egyes PA-k koncentrációja, sem arányuk és az összes PA koncentráció nem mutatott jelentős eltérést a kontrollhoz képest (9. ábra).



9. ábra: A szabad poliaminok (PA) koncentrációinak változásai csíranövényekben. A kontroll (K), illetve az 50 μM ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett paradicsom csíranövényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük azok **(A)** putreszcin (Put), **(B)** spermidin (Spd), illetve **(C)** a spermin (Spm) tartalmát. Az eredményekből kiszámoltuk **(D)** a szabad poliaminok (PA) teljes mennyiségét, továbbá **(E)** a PA-k arányát. $n = 3$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

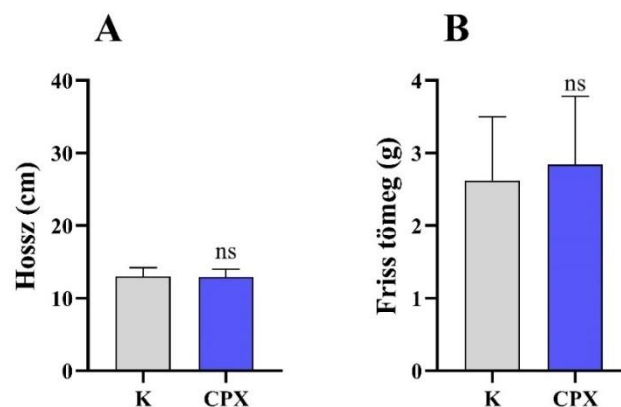
Mivel a PA-k lebontása erősen befolyásolja a PA-k mennyiségét, így megvizsgáltuk a két enzim, a DAO és a PAO enzimek aktivitásait. Eredményeink alapján szintén nem volt megfigyelhető jelentős változás a CPX hatására az enzimek aktivitásaiban (10. ábra).

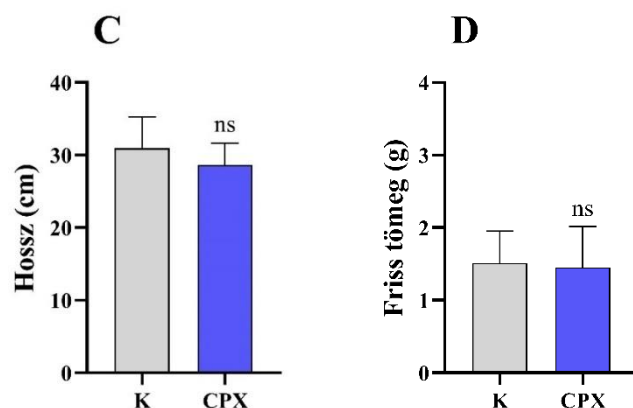


10. ábra: A PA lebontó enzimek (diamin-oxidáz [DAO; EC.1.4.3.22], poliamin-oxidáz [PAO; EC 1.5.3.3]) aktivitásai csíranövényekben. A kontroll (K), illetve az 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknak kitett paradicsom csíranövényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük azok **(A)** DAO, illetve **(B)** PAO enzimaktivitását. $n = 6$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

7.3. A CPX kezelés hatása a kifejllett paradicsom növények fejlődésére

A kifejllett paradicsom növények CPX kezelésére az 50 μ M-os kezelést 24 óráig folytattuk. A kezelés nem indukált jelentős eltéréseket a hajtás- és gyökérhosszokban, valamint a friss tömeg értékekben jelezve, hogy a CPX kezelés nem volt toxikus hatású (11. ábra).

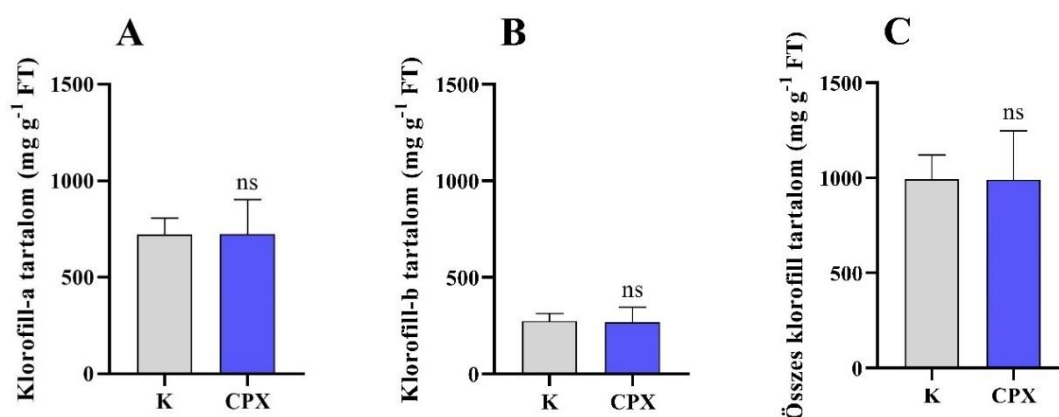




11. ábra: A 4 hetes paradicsom növények biomassza paramétereinek változása ciklopirox (CPX) kezelés hatására. Megmértük a kontroll (K), illetve az 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknél kitett paradicsom növények (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) hajtásainak (A) hosszát és (B) friss tömegét, illetve a gyökereinek (C) hosszát és (D) friss tömegét. $n = 4$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

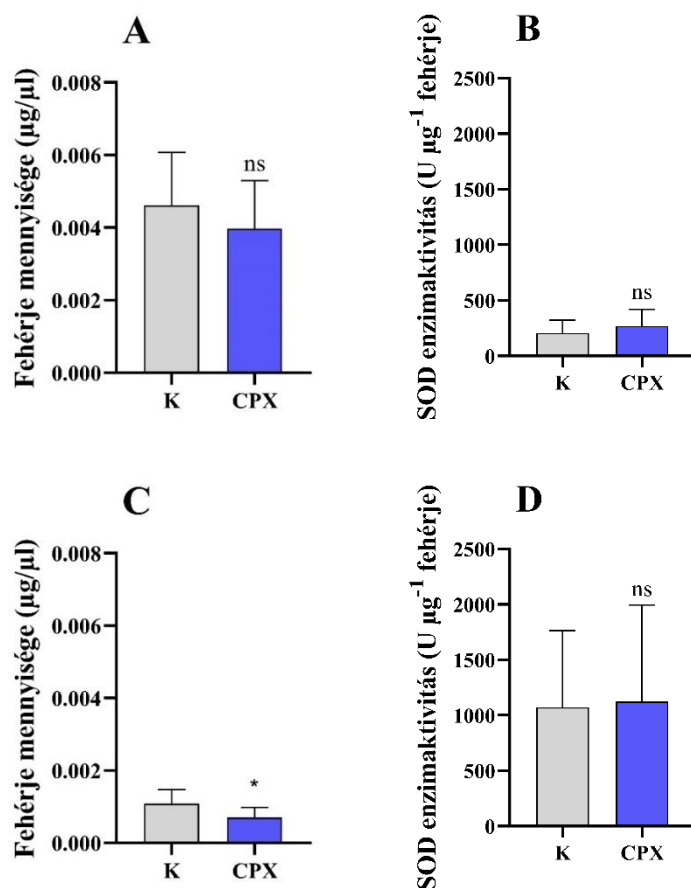
7.4. A CPX kezelés hatása a kifejtett paradicsom növények biokémiai paramétereire

A CPX kezelés hatását a fotoszintézis hatékonyságára a kifejtett paradicsom növények leveleiből pigmenttartalom vizsgálatot végeztünk. A kezelés során nem volt kimutatható 24 óra után a pigmentek tartalmában jelentős eltérés (12. ábra).



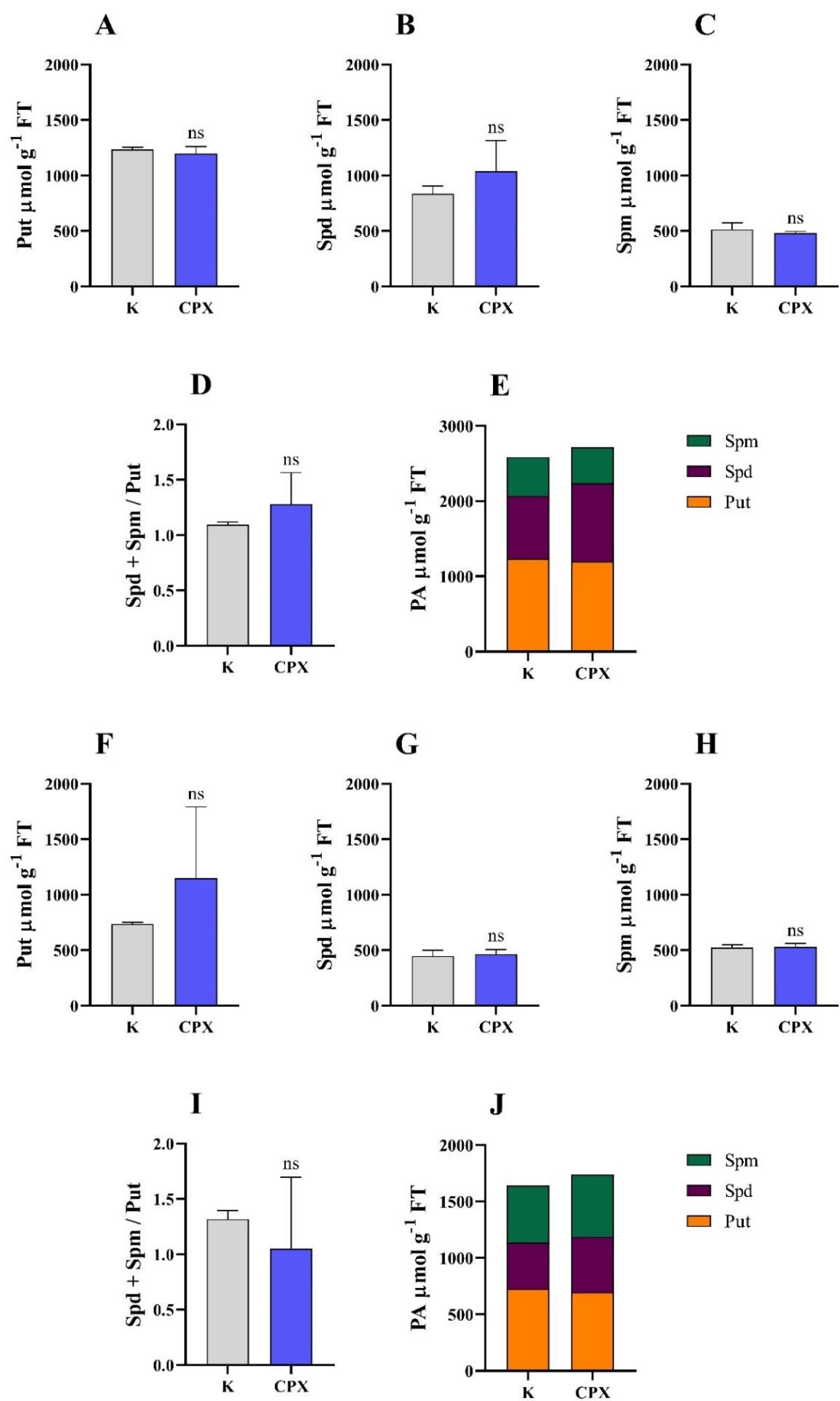
12. ábra: Pigmenttartalom változása a hajtásokban. A kontroll (K), illetve az 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknél kitett paradicsom növényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük a hajtások (A) klorofil-a és (B) klorofil-b tartalmát, illetve ezekből kiszámoltuk (C) az összes klorofil tartalmát. $n = 12$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

Bár a fehérjemennyiség a CPX kezelt gyökerekben kis mértékben csökkent, a SOD enzimaktivitás és a hajtás fehérje mennyisége nem mutatott jelentős eltérést a kontrollhoz képest (13. ábra).



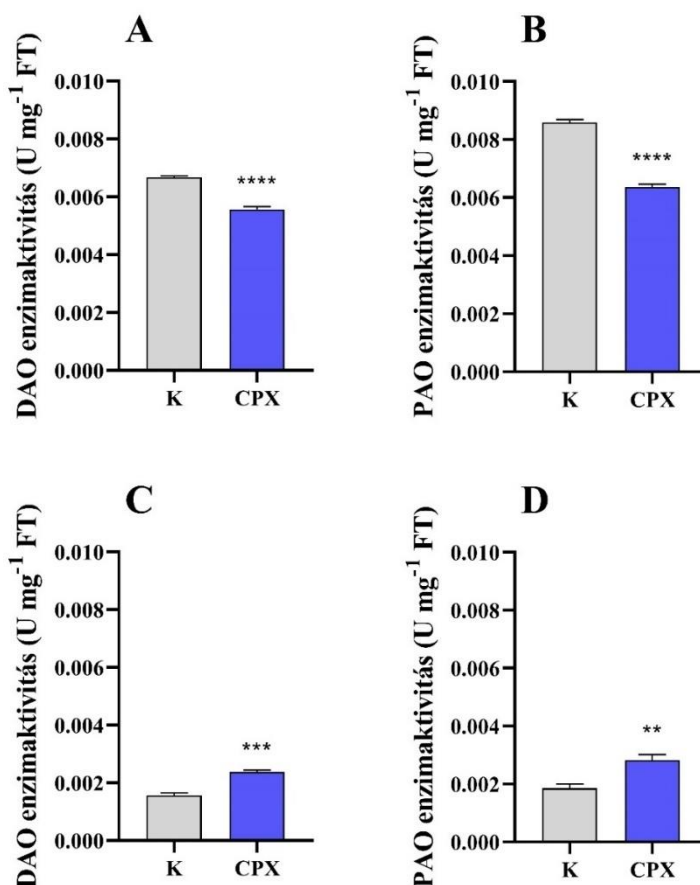
13. ábra: A fehérjék mennyisége, illetve a szuperoxid-dizmutáz (SOD; EC 1.15.1.1) enzimaktivitása hajtásokban és gyökerekben. A kontroll (K), illetve 50 µM ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett a paradicsom növényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük a hajtások **(A)** fehérje tartalmát és **(B)** SOD enzimaktivitását, illetve a gyökerek **(C)** fehérje tartalmát és **(D)** SOD enzimaktivitását. n = 6, átlagok ± SD, t-próba.

A kifejlett növények hajtásaiban és gyökereiben végzett vizsgálatok a PA metabolizmus kapcsán arra mutatnak, hogy a CPX 24 órás kezelés nem okozott eltérést a kontrollhoz képest sem a szabad PA tartalomban, sem az összes PA tartalomban (14. ábra).



14. ábra: A szabad PA koncentrációinak változásai kifejezett növényekben. A kontroll (K), illetve 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett a paradicsom növényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) megmértük a hajtások (A) putreszcin (Put), (B) spermidin (Spd) és (C) spermin (Spm) tartalmát, illetve a gyökerek (F) putreszcin (Put), (G) spermidin (Spd) és (H) spermin (Spm) tartalmát. Az eredményekből kiszámoltuk a hajtásban (D) a szabad poliaminok (PA) teljes mennyiségét és (E) a PA-ok arányát, továbbá a gyökérben (I) a szabad poliaminok (PA) teljes mennyiségét és (J) a PA-ok arányát. n = 3, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

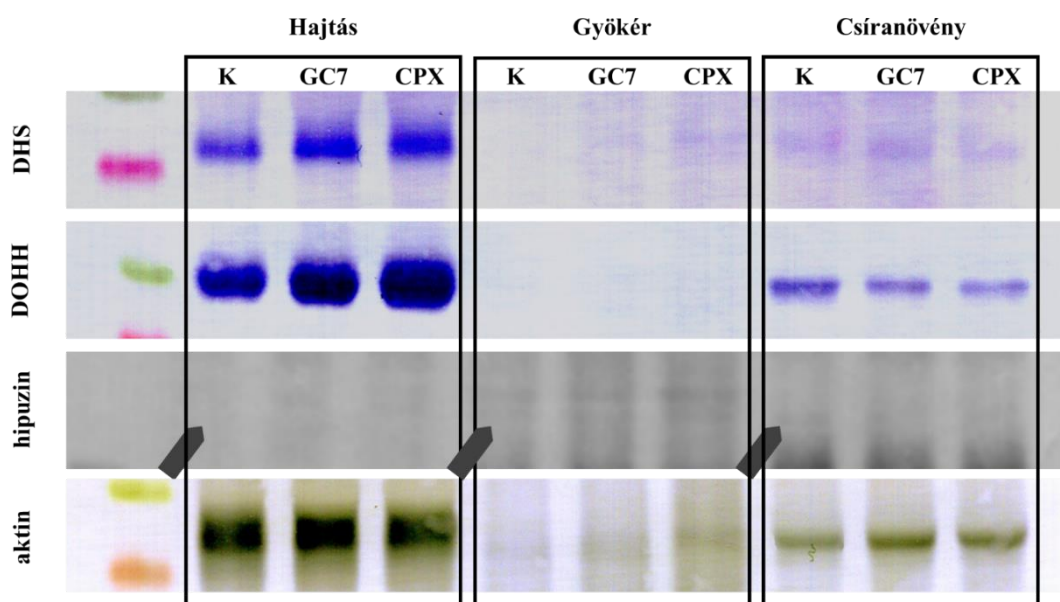
A PA lebontó enzimek aktivitásai gyökéren keresztül történő CPX kezelés hatására szervfüggést mutattak (15. ábra). A hajtásokban mindkét enzim aktivitása csökkent, míg a gyökerek enzimaktivitásai emelkedést mutattak. Az eredmények alapján feltételezhető egy kompenzációs mechanizmus a két szerv között a megfelelő PA homeosztázis alakulása érdekében.



15. ábra: A PA lebontó enzimek (diamin-oxidáz [DAO; EC.1.4.3.22], poliamin-oxidáz [PAO; EC 1.5.3.3]) aktivitásai hajtásban és gyökérben. A kontroll (K), illetve 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett a paradicsom növényekből (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego)

megmértük a hajtások **(A)** DAO és **(B)** PAO enzimaktivitását, illetve a gyökerek **(C)** DAO és **(D)** a PAO enzimaktivitását, $n = 6$, átlagok $\pm$ SD, t-próba.

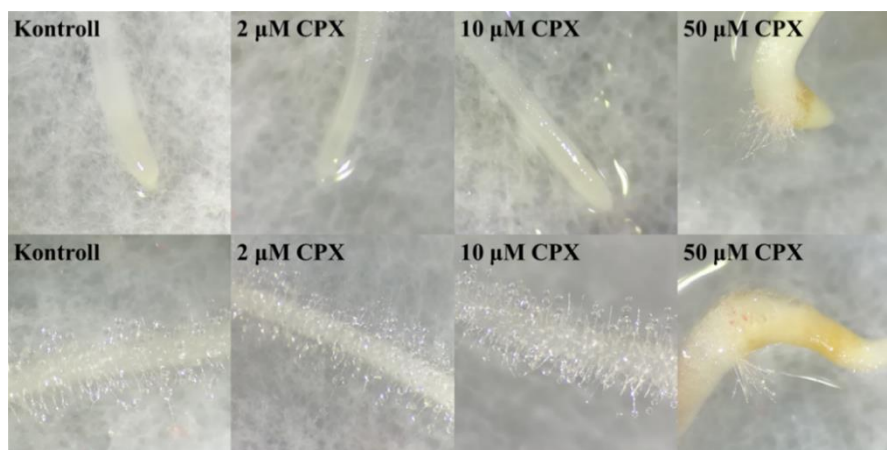
A hipuzináció sikerességét és a gátlószer alkalmazhatóságát western blot analízissel támasztottuk alá két fejlődési stádiumban és a kifejlett növény szerveiben (16. ábra). A hipuzináció főbb elemeit (DHS, DOHH és hipuzinált eIF5A) antitestek segítségével mutattuk ki. A CPX mellett a GC7 nevű DHS gátlószert alkalmaztuk, hogy nyomon kövessük a hipuzináció alakulását. Eredményeink azt mutatják, hogy fejlődésbeli és szervfüggő különbségek is megjelennek, mivel míg a DHS mindhárom szervben megjelenik, addig a DOHH a gyökérben nem volt kimutatható mennyiségben. Érdeemes megjegyezni, hogy a DOHH mennyisége nemcsak a CPX kezelés hatására, hanem a DHS gátlására is emelkedést mutatott. A hipuzin mennyisége mindhárom szervben esetén CPX hatására csökkenés volt tapasztalható, alátámasztva, hogy a CPX valóban gátolta a hipuzinációt (16. ábra).



16. ábra: DHS, DOHH, hipuzin és aktin kimutatása western blot analízissel. Kontroll (K), 50 μ M N^1 -guanil-1,7-diaminoheptán (GC7) illetve 50 μ M ciklopirox (CPX) kezeléseknak tettük ki a paradicsom (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) csíra- (72 órás kezelés) és kifejlett növényeket (24 órás kezelés). A növényi mintákból western blot analízissel kimutatásra kerültek a DHS, DOHH, hipuzin és aktin, amihez 7,5 μ g fehérjét tartalmazó kivonatot használtunk.

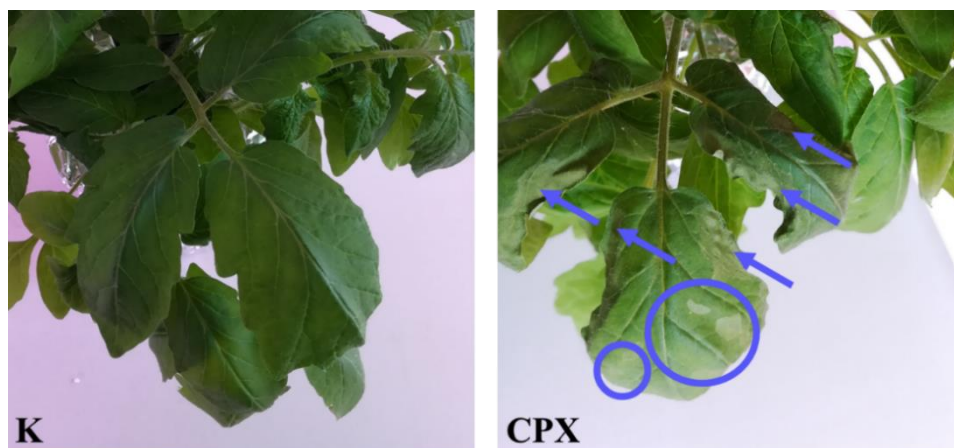
7.5. Felmerült kérdések

A csíranövények gyökerének morfológiai vizsgálata során az 50 μM CPX kezelt gyökerek stressz-indukált morfológiai válaszokat (Kolbert, 2016) mutattak sztereomikroszkóp alatt, ami felveti a hormonális átrendeződés kérdését (17. ábra). A kapott eredmények alapján a jövőben szeretnénk megvizsgálni a hipuzináció gyökérfejlődésben játszott szerepét.



17. ábra: A stressz-indukált morfológiai válaszok megjelenése az 50 μM ciklopirox (CPX) kezeléseknek kitett paradicsom csíranövényeken (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego).

A kifejlett növények esetében megvizsgáltuk a 48 órás kezelés hatását, ahol viszont a kezelés már toxikus hatású volt a paradicsom növények számára, aminek következtében a levéllemezekon szürkés, nekrotikus foltok (kék körök), illetve a levélszéli elhalások (kék nyilak) jelentek meg (18. ábra). A jövőben szeretnénk feltárni a toxikus hatások hipuzinációtól való függését.



18. ábra: Nekrotikus foltok megjelenése a leveleken. A 48 órán át tartó, 50 μM ciklopirox (CPX) kezelésnek kitett 4 hetes paradicsom növények (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) levelein szürke nekrotikus foltok lettek láthatóak.

8. Összefoglalás

A hipuzináció második, irreverzibilis lépését katalizáló enzim, a DOHH funkciójáról növényekben nem áll rendelkezésre információ. Munkámban célul tűztem ki, hogy egy, az állati rendszerekben használatos DOHH gátlószer alkalmazhatóságát vizsgálom meg paradicsom modellnövényben. Vizsgálataim során két fejlődési stádium, a csírázás és a kifejlett fiatal növények CPX gátlószerre adott válaszait figyeltem meg. Az általunk alkalmazott koncentrációk közül egyedül az 50 μM CPX kezelés hatására tapasztaltunk jelentős csírázásgátló hatást, ami a csíranövények hosszában és friss tömegében mutatkozott meg. A csíranövények biokémiai paraméterei nem mutattak toxikus hatást a fehérje és a SOD enzimaktivitásban, amit alátámasztottak a gyököcskék fluoreszcens festései is. A szabad PA spektrum vizsgálata, valamint a PA lebontó enzimek aktivitásai nem mutattak jelentős eltérést a CPX kezelt csíranövények esetében, alátámasztva azt, hogy a CPX kezelés nem befolyásolta jelentősen a PA metabolizmust, így a CPX kezelt csíranövényekben is megfelelő mennyiségű szubsztrát Spd állt rendelkezésre a hipuzinációhoz. A csíranövények esetében a western blot analízis során kimutattuk, hogy a CPX kezelés nem befolyásolta a DHS fehérje mennyiségét, míg a DOHH csökkenést mutatott, ami okozhatta a hipuzin csökkenését. Összefoglalva csíranövényekben a CPX a DOHH gátlásán keresztül volt képes a hipuzináció sikerességét csökkenteni és nem pedig a rendelkezésre álló PA metabolizmuson keresztül. A kifejlett növényeken végzett CPX kezelések során 24 óra elteltével nem tapasztaltunk semmilyen toxikus hatást a vizsgált paramétereken, sem a PA homeosztázison, egyedül a PA-k lebontását végző enzimek aktivitásai mutattak szervfüggő eltéréseket. Western blot analízissel bizonyítottuk, hogy a CPX kezelés hatására csökkent a hipuzin mennyisége, a DOHH viszont jelentős emelkedést mutatott a kontrollhoz képest a hajtásban, míg a gyökérben nem volt detektálható. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a CPX 24 óráig nem volt toxikus a paradicsom növények számára és a hipuzináció gátlása sikeresen megtörtént. A hosszabb távú CPX kezelés során stressz-indukált morfológiai válaszok jelentek meg a csíranövények gyökerein, valamint a hajtások nekrotikus foltokat mutattak, amelyek további vizsgálatokat igényelnek annak bizonyítására, hogy ezek a válaszok valóban a hipuzinációhoz kötődnek.

9. Felhasznált irodalom

Abbruzzese, A., Park, M. H., & Folk, J. E. (1986). Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 261(7), 3085-3089.

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., ... & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249.

Alcázar, R., Bueno, M., & Tiburcio, A. F. (2020). Polyamines: Small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells*, 9(11), 2373.

Anderson, W. F., Bosch, L., Cohn, W. E., Lodish, H., Merrick, W. C., Weissbach, H., Wittmann, H. G., and Wool, I. G. (1977). International symposium on protein synthesis Summary of Fogarty Center-NIH Workshop held in Bethesda, Maryland on 18–20 October, 1976.

Benne R, Hershey JW. (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Journal of Biological Chemistry* 253(9):3078–3087.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Chattopadhyay, M. K., Park, M. H., & Tabor, H. (2008). Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6554-6559.

Cheng, C. W., Chen, L. Y., Chou, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 262-267.

Clement, P. M., Hanauske-Abel, H. M., Wolff, E. C., Kleinman, H. K., & Park, M. H. (2002). The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *International journal of cancer*, 100(4), 491-498.

Dever, T. E., Gutierrez, E., & Shin, B. S. (2014). The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(5), 413-425.

Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., & Rodnina, M. V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science*, 339(6115), 85-88.

Faragó, D., Sass, L., Valkai, I., Andrási, N., & Szabados, L. (2018). PlantSize offers an affordable, non-destructive method to measure plant size and color in vitro. *Frontiers in plant science*, 9, 219.

- Gordon, E. D., Mora, R., Meredith, S. C., Lee, C. H. U. N. G., & Lindquist, S. L. (1987). Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(34), 16585-16589.
- Greggio, A. P., Cano, V. P., Avaca, J. S., Valentini, S. R., & Zanelli, C. F. (2009). eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(4), 785-790.
- Guo, Q., Zhang, Y. C., Wang, W., Wang, Y. Q., Liu, Y., Yang, Z., ... & Zeng, K. W. (2022). Deoxyhypusine hydroxylase as a novel pharmacological target for ischemic stroke via inducing a unique post-translational hypusination modification. *Pharmacological research*, 106046.
- Gutierrez, E., Shin, B. S., Woolstenhulme, C. J., Kim, J. R., Saini, P., Buskirk, A. R., & Dever, T. E. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Molecular Cell*, 51(1), 35-45.
- Han, Z., Sakai, N., Böttger, L. H., Klinke, S., Hauber, J., Trautwein, A. X., & Hilgenfeld, R. (2015). Crystal structure of the peroxo-diiron (III) intermediate of deoxyhypusine hydroxylase, an oxygenase involved in hypusination. *Structure*, 23(5), 882-892.
- Hanauske-Abel, H. M., Park, M. H., Hanauske, A. R., Popowicz, A. M., Lalande, M., & Folk, J. E. (1994). Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1221(2), 115-124.
- Hoque, M., Hanauske-Abel, H. M., Palumbo, P., Saxena, D., D'Alliessi Gandolfi, D., Park, M. H., ... & Mathews, M. B. (2009). Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. *Retrovirology*, 6(1), 1-17.
- Jakus, J., Wolff, E. C., Park, M. H., & Folk, J. E. (1993). Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13151-13159.
- Kang, H. A., & Hershey, J. W. (1994). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 3934-3940.
- Kang, K. R., Kim, Y. S., Wolff, E. C., & Park, M. H. (2007). Specificity of the deoxyhypusine hydroxylase-eukaryotic translation initiation factor (eIF5A) interaction: identification of amino acid residues of the enzyme required for binding of its substrate, deoxyhypusine-containing eIF5A. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8300-8308.
- Kemper, W. M., Berry, K. W., & Merrick, W. C. (1976). Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *Journal of Biological Chemistry*, 251(18), 5551-5557.

- Kolbert, Z. (2012). In vivo and in vitro studies on fluorophore-specificity. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(1), 37-41.
- Kolbert, Z. (2016). Implication of nitric oxide (NO) in excess element-induced morphogenic responses of the root system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 149-161.
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Pető, A., Feigl, G., Ördög, A., Kumar, D., ... & Erdei, L. (2012). Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5677-5687.
- Liao, D. I., Wolff, E. C., Park, M. H., & Davies, D. R. (1998). Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure*, 6(1), 23-35.
- Manchester, K. L. (1988). Nomenclature problems of protein synthesis initiation factors. *South African Journal of Science*, 84(6), 489.
- Mandal, A., Mandal, S., & Park, M. H. (2014). Genome-wide analyses and functional classification of proline repeat-rich proteins: potential role of eIF5A in eukaryotic evolution. *PloS one*, 9(11), e111800.
- Martinez-Rocha, A. L., Woriedh, M., Chemnitz, J., Willingmann, P., Kröger, C., Hädeler, B., ... & Schäfer, W. (2016). Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15.
- Mémin, E., Hoque, M., Jain, M. R., Heller, D. S., Li, H., Cracchiolo, B., ... & Mathews, M. B. (2014). Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. *Cancer research*, 74(2), 552-562.
- Moschou, P. N., Delis, I. D., Paschalidis, K. A., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiologia Plantarum*, 133(2), 140-156.
- Nishimura, K., Murozumi, K., Shirahata, A., Park, M. H., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2005). Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochemical Journal*, 385(3), 779-785.
- Oláh, D., Feigl, G., Molnár, Á., Ördög, A., & Kolbert, Z. (2020). Strigolactones Interact With Nitric Oxide in Regulating Root System Architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 11, 1019.
- Pálfi, P., Bakacsy, L., Kovács, H., & Szepesi, Á. (2021). Hypusination, a Metabolic Posttranslational Modification of eIF5A in Plants during Development and Environmental Stress Responses. *Plants*, 10(7), 1261.
- Park, J. H., Aravind, L., Wolff, E. C., Kaevel, J., Kim, Y. S., & Park, M. H. (2006). Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 51-56.

- Park, M. H., & Wolff, E. C. (2018). Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18710-18718.
- Park, M. H., Cooper, H. L., & Folk, J. E. (1981). Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2869-2873.
- Park, M. H., Lee, Y. B., & Joe, Y. A. (1997). Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Neurosignals*, 6(3), 115-123.
- Park, M. H., Nishimura, K., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino acids*, 38(2), 491-500.
- Patel, P. H., Costa-Mattioli, M., Schulze, K. L., & Bellen, H. J. (2009). The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *Journal of Cell Biology*, 185(7), 1181-1194.
- Pavlov, M. Y., Watts, R. E., Tan, Z., Cornish, V. W., Ehrenberg, M., & Forster, A. C. (2009). Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 50-54.
- Saini, P., Eyler, D. E., Green, R., & Dever, T. E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature*, 459(7243), 118-121.
- Schuller, A. P., & Green, R. (2018). Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 526-541.
- Schuller, A. P., Wu, C. C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R., & Green, R. (2017). eIF5A functions globally in translation elongation and termination. *Molecular cell*, 66(2), 194-205.
- Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, T., Nakajima, T., & Yasuo, K. (1971). Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain: Isolation and structural determination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 244(3), 523-531.
- Sievert, H., Pällmann, N., Miller, K. K., Hermans-Borgmeyer, I., Venz, S., Sendoel, A., ... & Balabanov, S. (2014). A novel mouse model for inhibition of DOHH-mediated hypusine modification reveals a crucial function in embryonic development, proliferation and oncogenic transformation. *Disease models & mechanisms*, 7(8), 963-976.
- Szepesi, Á. (2009a). Hosszútávú szalicilsav előkezelés hatása paradicsom növények sóstressz akklimatizációjára (Doctoral dissertation, szte).
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., & Tari, I. (2009b). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology*, 166(9), 914-925.

- Szepesi, Á.; Bakacsy, L.; Kovács, H.; Szilágyi, Á.; Köhler, Z.M. (2022) Inhibiting Copper Amine Oxidase Using L-Aminoguanidine Induces Cultivar and Age-Dependent Alterations of Polyamine Catabolism in Tomato Seedlings. *Agriculture*, 12, 274.
- Turpaev, K. T. (2018). Translation factor eIF5A, modification with hypusine and role in regulation of gene expression. eIF5A as a target for pharmacological interventions. *Biochemistry (Moscow)*, 83(8), 863-873.
- Urdiales, J. L., Medina, M. Á., & Sánchez-Jiménez, F. (2001). Polyamine metabolism revisited. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 13(9), 1015-1019.
- von Koschitzky, I., Gerhardt, H., Lämmerhofer, M., Kohout, M., Gehringer, M., Laufer, S., ... & Kaiser, A. (2015). New insights into novel inhibitors against deoxyhypusine hydroxylase from *Plasmodium falciparum*: compounds with an iron chelating potential. *Amino Acids*, 47(6), 1155-1166.
- Wang, J., Ma, Y., Wang, X., Zhang, Y., Tan, H., Li, X., & Chen, G. (2020). Theoretical study on the catalytic mechanism of human deoxyhypusine hydroxylase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(39), 22736-22745.
- Weir, B. A., & Yaffe, M. P. (2004). Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*, 15(4), 1656-1665.
- Wohlgemuth, I., Brenner, S., Beringer, M., & Rodnina, M. V. (2008). Modulation of the rate of peptidyl transfer on the ribosome by the nature of substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32229-32235.
- Wolff, E. C., Folk, J. E., & Park, M. H. (1997). Enzyme-substrate intermediate formation at lysine 329 of human deoxyhypusine synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15865-15871.
- Wolff, E. C., Park, M. H., & Folk, J. E. (1990). Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4793-4799.
- Wolff, E. C., Wolff, J., & Park, M. H. (2000). Deoxyhypusine synthase generates and uses bound NADH in a transient hydride transfer mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9170-9177.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szepesi Ágnes egyetemi adjunktusnak, hogy nemcsak lehetőséget biztosított a kutatómunkámhoz, melynek eredményei szolgáltak alapul a dolgozatomhoz, hanem lelkiismeretes hozzáállása következtében bármikor bizalommal fordulhattam hozzá, ha a segítségére, szakmai tanácsára, vagy akár a biztatására volt szükségem.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bakacsy László egyetemi tanársegédnek és Sípós Lillának a vizsgálatok lebonyolításában való közreműködésükért.

Hálával tartozom Dr. Molnár Árpádnak, hogy segítséget nyújtott a mintáim western blot analízisének kivitelezésében, illetve a kapott eredmények kiértékelésében.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fehér Attilának a SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék vezetőjének szakdolgozási lehetőségért a tanszéken, ahol a szükséges berendezések és műszerek a rendelkezésemre álltak.

Köszönöm továbbá a SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítségét, akik bármilyen formában hozzájárultak a munkámhoz.

Hálás vagyok barátnőmnek, Kovács Mercédesznek, aki nap, mint nap mellettem volt és segített engem mindenben, amiben csak tudott, hogy zavartalanul a kutatásomra és a dolgozatom megírására tudjak koncentrálni.

Köszönöm még családomnak és barátaimnak, hogy munkám során végig számíthattam támogatásukra és szeretetükre is.

A kutatás pénzügyi háttérét az NKFIH FK129061 (Dr. Szepesi Ágnes), valamint a Miniszterelnökség és a Nemzeti Tehetség Program támogatásával az NTP-NFTÖ-21-B-0238 (Pálfi Péter) pályázatok biztosították.



AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

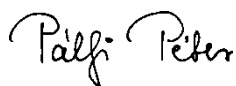


11. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Pálfi Péter** nyilatkozom, hogy a 2023-as 36. OTDK-ra benyújtott **A hipuzináció gátlására használt ciklopirox hatása a különböző életkorú paradicsom növények fejlődésére** című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Rész/feladat	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
<i>a növényi biomassza előállítása</i>	100	0
<i>a paradicsom növények kezelése ciklopiroxszal</i>	100	0
<i>előzetes kísérletek</i>	100	0
<i>biokémiai paraméterek mérése</i>	80	20
<i>western-blot analízis</i>	20	80
<i>eredmények kiértékelése, diagramok készítése</i>	80	20
<i>dolgozat megírása</i>	100	0

Kelt: Szeged, 2022. június 18.



Pálfi Péter

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Szepesi Ágnes, témavezető

egyetemi adjunktus

SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék

12. Nyilatkozat

Alulírott, Pálfi Péter biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy az OTDK dolgozatomban ismertettek saját munkám eredményei, és minden felhasznált nem saját munkából származó eredmény esetén hivatkozással jelöltem annak forrását.

Szeged, 2022. június 18.

