

36. OTDK Biológia Szekció

A szalicilsav hatása a glutation metabolizmusára ER-stressz alatt

Milodanovic Dávid

Biológus MSc., II. évf.

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Poór Péter



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke.....	3
Tartalmi összefoglaló.....	4
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1. Az ER-stressz	5
1.2. A szalicilsav (SA).....	9
1.3. Az ER-stressz és az SA	9
1.4. A GSH metabolizmusa.....	11
1.5. A GSH metabolizmusa és az ER-stressz	12
1.6. A GSH és az SA	13
2. Célkitűzések	15
3. Anyagok és módszerek	16
3.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése	16
3.2. RNS izolálás, DNáz kezelés, cDNS írás, qRT-PCR	16
3.3. A szuperoxid-gyökanion kvantitatív meghatározása	17
3.4. A hidrogén-peroxid kvantitatív meghatározása	18
3.5. A nem-enzimatis antioxiidáns tartalom meghatározása	18
3.5.1. A glutation tartalom	18
3.6. A glutation metabolizmusával kapcsolatos enzimek aktivitásának meghatározása... ..	19
3.6.1. Glutation reduktáz (GR).....	19
3.6.2. Dehidroaskorbát reduktáz (DHAR).....	19
3.6.3. Glutation peroxidáz (GPOX)	20
3.6.4. Glutation transzferáz (GST)	20
3.7. A lipidperoxidáció mértékének meghatározása	20
3.8. Az életképesség meghatározása – elektrolit kieresztés (EL) mérése	21
3.9. Az adatok feldolgozása és értékelése	21
4. Eredmények	22
4.1. A markergének expressziójának változása.....	22
4.2. A reaktív oxigénformák produkciójának változása.....	23
4.3. A glutation mennyiségének változása	24
4.4. A glutation metabolizmusban szerepet játszó enzimek aktivitásának változása.....	25
4.5. A glutation metabolizmusában szerepet játszó főbb enzimeket kódoló gének transzkripció változása.....	26
4.6. A lipidperoxidáció és az életképesség változása.....	28
5. Eredmények értékelése.....	29
6. Irodalomjegyzék	32
7. Köszönetnyilvánítás.....	38
8. Függelék.....	39
9. Tételes szerzői hozzájárulás.....	40

Rövidítések jegyzéke

ASC: aszkorbát

BiP: „luminal binding protein”

bZIP: bázikus leucin cipzár

CAT: kataláz

CDNB: 1-klór-2,4-dinitrobenzol

DHAR: dehidroaszkorbát reduktáz

DTNB: 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoészav

DTT: ditiotritol

ER: endoplazmatikus retikulum

ERAD: ER-hez kötődő protein lebontás

ERO: ER protein tiol diszulfid

oxidoreduktáz

ERSE: ER stresszválasz elem

ET: etilén

GGC: gamma-glutamil ciklotranszferáz

GGT: gamma-glutamil transzpeptidáz

GPOX: glutation peroxidáz

GR: glutation reduktáz

GSH: redukált glutation

GSSG: oxidált glutation

GST: glutation transzferáz

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HR: hiperszenzitív válasz

HSP: hőshock fehérje

ICS: izokorizmat szintáz

IRE: inozitol-függő enzim

JA: jázmonsav

MDA: malondialdehid

NBT: „nitro blue tetrazolium”

NEM: N-etilmaleimid

O₂^{•-}: szuperoxid-gyökanion

PAL: fenilalanin-ammónia-liáz

PBA: 4-fenilvajsav

PCD: programozott sejthalál

PDI: protein diszulfid izomeráz

PER: peroxidáz

PR: patogenezis-kapcsolt

ROS: reaktív oxigén formák

RT-qPCR: kvantitatív valós idejű

polimeráz láncreakció

SA: szalicilsav

SAR: szisztematikus szerzett rezisztencia

SOD: szuperoxid-dizmutáz

TCA: triklórecetsav

Tm: tunikamicin

UPR: „unfolded protein response”

UPRE: „unfolded protein response element”

Tartalmi összefoglaló

A növényi életfunkciók fenntartásához elengedhetetlen a fehérjék szintézise és megfelelő feltekeredése, melynek helye a sejtben az endoplazmatikus retikulum (ER). Stressz során az élettani folyamatok jelentősen megváltozhatnak, több hibás szerkezetű fehérje jöhet létre, melyek bontása során a redukált glutation (GSH) felhasználódik és oxidálttá (GSSG) alakul. Ugyanakkor a glutation metabolizmusának hormonális szabályozása az ER-stressz alatt nem teljesen ismert még növényekben. A szalicilsav (SA), mint növényi hormon fontos szerepet játszik a növények védekezésében többek között a redox jelátvitel és az antioxidáns védelmi rendszer szabályzásával. Kísérleteink célja az SA glutation metabolizmusára gyakorolt hatásának felderítése az ER-stressz során. Méréseinkhez intakt paradicsom növények leveleit használtunk fel, melyeket 24 órás SA kezelésnek tettünk ki. Az ER-stresszt tunikamicin (Tm) segítségével idéztük elő, mérséklésére pedig 4-fenilvajsavat (PBA) használtunk. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az SA és a Tm kezelések is fokozták az SA markergén *PR1* expresszióját, mely azonban a Tm kezelés hatására szignifikánsan nagyobb volt, amit a PBA kezelés mérsékelte. Az ER-stressz markereként a *BiP* expresszióját vizsgáltuk meg, mely hasonlóan változott a *PR1* généhez, az SA és Tm kezelések fokozták azt, a PBA pedig csökkentette. A Tm és SA kezelések növelték a szuperoxid gyökanyon és hidrogén-peroxid szinteket a levelekben. Az oxidatív stressz eredményeként nőtt a Tm és SA kezelések hatására a lipidperoxidáció és az ionkieresztés is, melyet azonban a kombinált kezelés mérsékelte az SA kezeléshez képest. Megvizsgáltuk az ER-stressz során kulcsszereppel bíró glutation metabolizmusát is a növényekben. Érdekes módon minden kezelés fokozta a GSH és GSSG tartalmakat a 24. órában. Míg a Tm kezelés csak kismértékben befolyásolta a glutation metabolizmusában szerepet játszó kulcsenzimek, a glutation reduktáz (GR), glutation peroxidáz (GPOX) és glutation transzferáz (GST) aktivitását és az őket kódoló gének expresszióját, addig az SA kezelés jelentős mértékben növelte azt. Méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy az SA önmagában is képes ER-stressz kiváltására, mely oxidatív robbanáshoz és ezáltal az életképesség csökkenéséhez vezet, ez azonban a Tm kezelés által kiváltott ER-stressz alatt mérséklődik. Az eredményeink alapján a folyamatban az SA által szabályozott glutation metabolizmusának kulcsszerepe van.

Kulcsszavak: ER stressz; glutation; reaktív oxigénformák; szalicilsav; tunikamicin

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az ER-stressz

A növényekre ható stresszt különböző stresszfaktorok váltják ki. Ezek lehetnek abiotikusak (pl.: só, napsugárzás, mechanikai hatások) vagy biotikusak (pl.: vírusok, baktériumok, gombák, rovarok). Az ilyen hatások ellen a növények folyamatosan védekeznek, mely a fehérjék szintézisében is kifejeződik. A folyamat központi sejtstruktúrája az endoplazmatikus retikulum (ER), és annak lumene. Ez egy specifikus, erősen oxidatív környezet, melynek a fehérjék feltekeredésében, azon belül is a diszulfidhidak kialakításában van jelentős szerepe (Xu és mtsai., 2005).

Stressz hatására az ER-ben fokozódik a fehérjék termelése, ez azonban több hibás térszerkezetű protein kialakulásához vezethet, mivel a lebontó rendszer nem mindig képes lépést tartani az új fehérjék keletkezésével. Ezek a nem, vagy rosszul feltekeredett fehérjék felgyűlhetnek az ER lumenében, és így ER-stresszt váltanak ki (Iwata és Koizumi, 2012). A folyamat következményeként kialakuló választ „unfolded protein response”-nak (UPR) nevezzük.

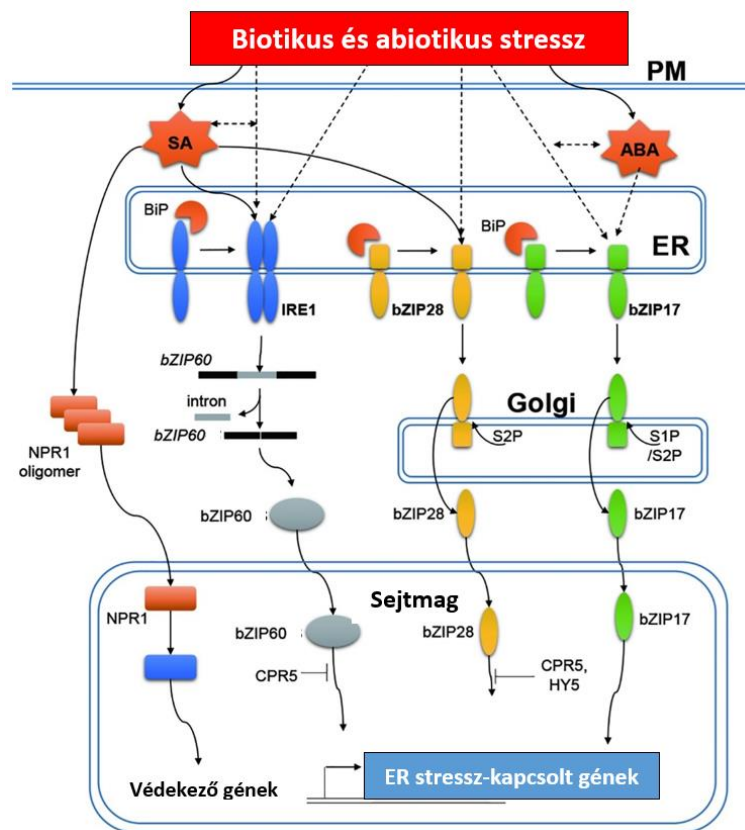
Ez a védekező mechanizmus, dajkafehérjék (chaperonok) szintézisével, a fehérjék keletkezésének kiegyensúlyozásával és az ER-hez kötődő protein lebontás (ERAD) aktiválásával segít megőrizni a sejtek homeosztázisát (Liu és Howell, 2016). Ezen folyamatok eltávolítják a rosszul hajtogatott proteineket, valamint fokozzák az új fehérjék termelésének képességét. Végző esetben, a súlyos vagy visszafordíthatatlan stressz hatására programozott sejthalál (PCD) indukálódik a növényekben (Chen és Brandizzi, 2013; Poór és mtsai., 2019).

Az UPR folyamatának két fő ága növényekben a bázikus leucin cipzár 28 (bZIP28), illetve az inozitol-függő enzim (IRE1) által szabályozott útvonal (1. ábra). Mindkét folyamat elindításában kulcsszerepet kap egy speciális molekuláris chaperon, a „luminal binding protein” (BiP). Normál körülmények közt a BiP más dajkafehérjékkel együtt segíti a fehérjék feltekeredését és gátolja azok aggregációját (Otero és mtsai., 2010), illetve az UPR folyamatát vezénylő faktorok mobilizálódását is megakadályozza. Stressz esetén ez azonban megváltozik, a BiP disszociációja a bZIP28-ról, illetve az IRE1-ről elindítja az UPR-t (Srivastava és mtsai., 2014; Oikawa és mtsai., 2009).

A bZIP28 egy 2-es típusú membrán protein (Srivastava és mtsai., 2014), mely a rosszul hajtogatott fehérjék hatására aktiválódik az ER lumenében. A BiP disszociációt követően egy „coat protein” II vezikulumba (COPII) csomagolva az ER-ből a Golgiba kerül, ahol a „site-2” proteáz (S2P) proteolitikusan hasítja. Ezt követően a hasított bZIP28 a sejtmagba kerül, ahol az

ER stresszválasz (ERSE) promóter elemhez csatlakozik és speciális stresszválasz géneket aktivál (Srivastrava és mtsai., 2012; Poór és mtsai., 2019).

A másik útvonal első lépéseként az IRE1 „felszabadul” a BiP gátlás alól, a luminális doménje hozzákapcsolódik a rosszul hajtogatott fehérjék hidrofób részéhez, melyet követően dimerizálódik, illetve oligomerizálódik (Shamu és Walter, 1996). Az IRE1 az N-terminális végén lévő luminális doménjével érzékeli a bekövetkezett változásokat és a membránon keresztül képes RNáz doméneknek eljuttatni az ER-stressz jelet (Zhang és mtsai., 2016). Ennek a folyamatnak az eredménye lesz az IRE1 mediálta bZIP60 mRNS hasítás, mely hasított bZIP60 transzkripciósfaktor (Nagashima és mtsai., 2011) transzlálódik és a sejtmagba transzportálódik, ahol az ún. „unfolded protein response element” (UPRE) és ERSE cisz-ható elem tartalmú UPR gének kifejeződését aktiválja (Iwata és Koizumi, 2012; Poór és mtsai., 2019).



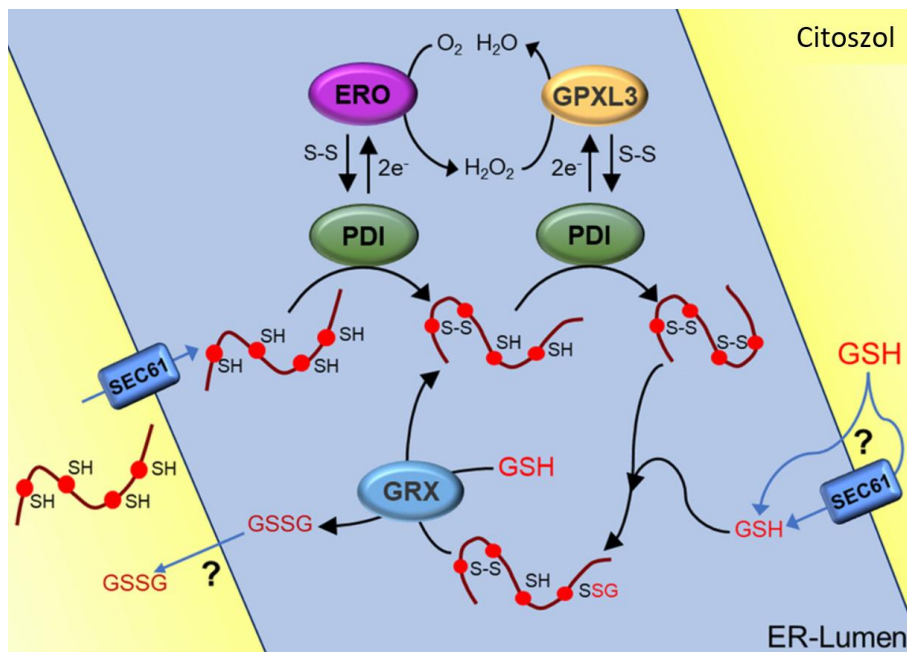
1. ábra: A SA és az ER-stressz kapcsolata (Park és Park, 2019 alapján). ABA: abszcizinsav, BiP: „luminal binding protein”, bZIP: bázikus leucin cipzár, CPR: „constitutive expressor of pathogenesis-related genes”, IRE: inozitol-függő enzim, NPR: „non-expressor of pathogenesis-related genes”, SA: szalicilsav, S1P és S2P: „site” 1 és 2 proteáz.

A két folyamat az ER-stressz kezelésének két különálló ágát alkotja, azonban megfigyeltek együttműködésükre utaló jeleket is. Élesztő két-hibrid rendszerben a bZIP60 képes heterodimert képezni a bZIP28-cal (Liu és Howell, 2010), illetve néhány gén, mint a BiP3 aktiválásához a bZIP28-ra és bZIP60-ra is szükség van (Iwata és mtsai., 2008).

Stressz során is létfontosságú a fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakítása, melynek egyik, az ER-ben zajló lépése a diszulfidhidak kialakulása, vagyis az „oxidatív protein folding” (2. ábra). Ez egy poszttranszlációs módosítás, melyhez oxidáló környezetre van szükség (Meyer, 2019), ennek a feltételnek az ER megfelel, mivel a citoszolhoz képest akár kb. 100 mV-al is magasabb redox potenciállal rendelkezhet (Birk és mtsai., 2013). A citoplazma redukált közeg, itt a fehérjék nem-feltekert és védett helyzetben vannak a dajkafehérjék miatt, a ciszteinjeik redukált állapotban maradnak. A naszcens polipeptideken csupán transzlokációjuk közben megy végbe az „oxidatív protein folding” (Meyer és mtsai., 2021).

Az oxidáló környezettel rendelkező sejtrészekbe „diszulfid relé rendszerek” juttatják be a diszulfidhidakat. Ennek részei, egy, a diszulfidhidat generáló tiol oxidáz, illetve egy tiol oxidoreduktáz, mely szabályozza a szállításukat a specifikus szubsztrát proteinekhez. Utóbbiba tartoznak a protein diszulfid izomerázok (PDI), melyeket egy ER oxidoreduktáz (ERO) oxidál (Meyer és mtsai., 2019). Az ERO egy glikolizált flavoenzim, mely szorosan kötődik az ER membrán luminális részéhez, míg a PDI egy tioredoxin szerű fehérje, mely képes a diszulfidkötések redukálására, oxidálására és izomerizációjára is (Pollard és mtsai., 1998). Egy elektronszállító rendszerre is szükség van a szubsztrát és az akceptor közt, mely általában a molekuláris oxigén (Meyer, 2019). A fehérjék érése során a kötések a PDI fehérjék és a célfehérjék tiol csoportjai közt keletkeznek, azonban ez az enzim egyedül nem képes új diszulfidhidat létrehozni. A folyamat során egy oxidáló ágensre van szükség, mert a PDI két tioredoxin doménje redukálódik. Ezt a szerepet az ERO1 játssza (Urade, 2019). Az ERO enzim N-terminális transzmembrán része segítségével horgonyozza magát az ER lumenbe, illetve enzimatis részével transzferálja a fehérjét a PDI-ről a molekuláris oxigénre. Ehhez azonban sok mozgató („shuttle”) ciszteinre és FAD kofaktorra van szükség, mely az eukarióták nagy részében erősen konzervált (Aller és Meyer, 2013).

Stressz alatt tehát az ER-ben fokozódik a fehérjék szintézise, ezzel együtt a nem megfelelő aminosavak közt kialakuló („mismatched”) diszulfidhidak száma is, melyek lebontása közben a redukált glutation (GSH) oxidálttá (GSSG) alakul. Amennyiben ez az állapot sokáig tart, a GSH készlet nagy része oxidálódhat (Ozgur és mtsai., 2018). Emellett a diszulfidhíd-formáció fokozódásával, emelkedik a PDI-ERO1 aktivitása, ami magasabb H₂O₂ szinthez vezethet (Ozgur és mtsai., 2014).



2. ábra: „Oxidatív protein folding” folyamata (Meyer és mtsai., 2021 alapján). ERO: ER oxidoreduktáz, GPXL3: glutation peroxidáz-szerű enzim 3, GRX: glutaredoxin PDI: protein diszulfid-izomeráz, GSSG: oxidált glutation, GSH: redukált glutation.

Az ER-stressz együtt jár a redox metabolizmus jelentős megváltozásával, valamint reaktív oxigénformák (ROS) erőteljes keletkezésével (Ozgur és mtsai., 2014). A ROS keletkezése elsősorban a mitokondriális és kloroplasztikus elektrontranszportlánc működése, a plazmamembrán NADPH oxidázai, valamint a peroxiszómák és az ER-ben történő „oxidatív protein folding” által történhet (Attacha és mtsai., 2017). A ROS metabolizmusa rendkívül fontos mind a biotikus, mind pedig az abiotikus stresszfolyamatokban. Az elnevezés az oxigén szabadgyökökre és bomlástermékeikre utal, melyek a következők lehetnek: hidrogén- peroxid (H_2O_2), szuperoxid gyökanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), és hidroxil gyök ($\cdot\text{OH}$) (Mittler, 2017). Keletkezésük az aerob metabolizmus természetes velejárója, azonban stressz alatt felborul az egyensúly a keletkezésük és a lebontásuk között (Mittler és mtsai., 2004). Kis mennyiségben elengedhetetlenek a jelátviteli folyamatokban (pl. H_2O_2), stressz alatt azonban toxikus mennyiségben halmozódhatnak fel, oxidatív stresszt kiváltva és károsítva a DNS-t, RNS-t, fehérjéket és a sejtmembránokat is (Mittler, 2017). A károsodás kivédésére a növényekben enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns rendszerek fejlődtek ki. A legfontosabb enzimatis antioxidánsok a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz (CAT), a peroxidáz (PER) és glutation peroxidáz (GPOX) enzimek. A nem enzimatis antioxidánsok közül a legfontosabbak a glutation, illetve az aszkorbát, de fontosak meg a karotinoidok, flavonoidok, és a tokoferol is (Mittler, 2017; Cao és mtsai., 2022).

1.2. A szalicilsav (SA)

A szalicilsav (SA) a növényi fenolvegyületek közé tartozó vegyület. A növényekben hormonként modulálja többek között a növekedést és fejlődést, a fotoszintézist és a virágzást. A redox jelátvitel és az antioxidáns védelmi rendszer befolyásolásával kulcsszerepet játszik a növények védekezésének szabályzásában, a PCD vagy a rezisztencia folyamatok kiváltásában (Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011; Saleem és mtsai., 2021). Az SA szintézisének két útja ismert: citoplazmában fenilalaninból, transz-fahéjsavon és benzoesavon keresztül keletkezik a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) segítségével, illetve a plasztiszban az izokorizmátból az izokorizmát szintáz (ICS) által katalizálva. Mindkét bioszintézis-útvonal hozzájárul mind az alap, mind pedig a stressz-indukált SA akkumulációjához (Dempsey és mtsai., 2011; Lefevere és mtsai., 2020). A növényekben lévő SA koncentrációk és a hormonhoz köthető funkciók azonban nagy változatosságot mutatnak a különböző növényfajokban, szervekben, de a kísérletek során döntő lehet a kezelés módja, időtartama, illetve a napszak és a fényintenzitás is (Raskin és mtsai., 1990; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011).

1.3. Az ER-stressz és az SA

Az SA és a ROS a stresszfolyamatok során kölcsönösen hatnak egymásra (Holuigue és mtsai., 2007; Herrera-Vásquez és mtsai., 2015). A hormon képes ROS felhalmozódást (pro-oxidáns) és ROS lebontást (antioxidáns) előidézni a különböző környezeti ingerekre adott válaszként (Miura és Tada, 2014). Az SA alacsony koncentrációknál olyan mértékű ROS képződést indít el, mely fokozza a növények antioxidánsok általi védekezését, azonban a magas SA koncentrációk hatására a ROS olyan mértékű akkumulációja történik, mely oxidatív stresszt és akár PCD-t is kiválthat (Lee és mtsai., 2010; Saleem és mtsai., 2021). Ez főleg lebontó enzimek (CAT, PER) gátlásán keresztül valósul meg (Durner és Klessing, 1995).

A növényekben a patogének ellen kétféle fő védekező reakció alakult ki. A konstitutív válasz mindig aktív, míg az indukált védelmi válasz csak patogének támadása esetén működik. A fertőződés hatására hiperszenzitív válasz (HR) alakul ki (Velásquez és mtsai., 2018). E folyamat során gyors és lokalizált PCD történik a fertőzés helyén, megakadályozva a kórokozók tovább terjedését (Goodman és Novacky, 1994). A HR után egy másodlagos védelmi válasz is aktiválódik, melyet szisztematikus szerzett rezisztenciának hívunk (SAR) (Ding és Ding, 2020). A SAR során a még egészséges növényi részekbe vagy más növényekbe importálódnak kémiai jelek, ahol a patogének elleni nagyobb rezisztenciát létrehozó folyamatokat indukálnak (Singh és mtsai., 2017). Ennek a szabályzásában más hormonoknak, mint például az etilénnek (ET) és

jázmonsavnak (JA) is szerepe van (Yang és mtsai., 2013). Stressz alatt az SA hatására másodlagos metabolitokat, antioxidáns enzimeket, hősokk fehérjét (HSP) és dajkafehérjét kódoló gének aktiválódnak (Janda és mtsai., 2020; Saleem és mtsai., 2021).

Az SA által indukált jelátvitel kulcsmolekulája a „non-expressor of pathogenesis-related genes 1” (NPR1) (Cao és mtsai., 1997), melynek monomerizációját és sejtmagba történő transzlokációját az SA befolyásolja, illetve a hormon befolyásolta gének expressziós változásainak nagy része NPR1-függő (Mou és mtsai., 2003).

Stressz hatására tehát a növényekben magasabb SA szinteket mérhetünk, mely hatására ROS akkumuláció történik, mely a fehérjék oxidációjához és sejthalálhoz vezethet (Vlot és mtsai., 2009). A hormon hatására speciális gének, az ún. patogenezis-kapcsolt (PR) gének expresszálódnak, melyek keletkezéséhez elengedhetetlen a fehérje hajtogató rendszer megfelelő működése (Wang és mtsai., 2005). A PR fehérjék antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkeznek, patogének hatására indukálódik átírásuk. A PR gének SA mediáltak, SA markerként is ismertek a fertőzött növényekben (Zhang és mtsai., 2010). A fehérjék több, különböző módon játszhatnak szerepet a növények védekezésében. Többek között a PR1 szterol kötő aktivitást mutat, ehhez kötve gátolja a patogének működését. A PR2 egy β -1,3-glukanáz, ami a bakteriális és fungális sejtfalat képes lebontani, míg a PR3 és PR4 fehérjék kitinázok (Selitrennikoff, 2001; Saleem és mtsai., 2021).

A SAR során a védekezéshez szükséges, SA függő ER-stressz gének NPR1 függő aktivációt mutatnak *Arabidopsis*-ban. Ezek közé tartozik a Sec61 ER membrán csatorna és a „signal recognition particle” (SRP) receptor, különböző dajkafehérjék (pl.: BiP, kalnexin, kalretikulin), valamint a PDI is. Wang és mtsai. szerint a SA mintegy felkészíti az ER-t a stressz során a megemelkedett igénybevételre (Wang és mtsai., 2005).

Stresszmentes körülmények közt az NPR1 a citoszolban lokalizálódik oligomerként, amit a molekulán belüli diszulfidhidak tartanak össze. Stressz alatt nő az SA koncentrációja, melynek hatására redox változások következnek be és az NPR1 redukálódik a tioredoxin segítségével, illetve monomerizálódik (Mou és mtsai., 2003; Kneeshaw és mtsai., 2014). Az NPR1 ezt követően a sejtmagba transzportálódik, ahol a WRKY vagy TGA transzkripciós faktorokkal kölcsönhatva befolyásolja a SA függő génexpressziót (pl.: PR1 átírása) (Fan és Dong, 2002; Pandey és Somssich, 2009). A TGA-transzkripciós faktorok a bZIP-ek közé tartoznak, két SA függő osztályuk van: az első osztályba tartozók redox szenzorok, képesek módosítani ciszteineik oxidatív állapotát az NPR1-el való kötés során (Spoel és Loake., 2011). A 2-es osztályú TGA-ra az SA-mediált védekezési gének kifejezéséhez van szükség (Herrera-Vásquez és mtsai., 2014). Amikor az NPR1 belép a sejtmagba a TGA-t köti a PR1 promóter

régiójához, aktiválva ezzel a gén expresszióját (Johnson és mtsai., 2003). A *PR1* és *NPR1* gének regulációját a WRKY transzkripciós faktorok is végzik, melyek egy, a SA bioszintézist szabályzó, visszacsatoló mechanizmust kódolnak (Seyffreth és Tsuda, 2014; Saleem és mtsai., 2021).

Az NPR3 és NPR4 is SA receptorok, de transzkripcionális gátlóként akadályozzák az NPR1 funkcióját az SA hiánya esetén. Emellett az SA jelátvitelre is negatívan hatnak az NPR1 degradációja által (Ding és mtsai., 2018, Saleem és mtsai., 2021).

Meglepő módon azonban *npr1-1* hiánymutáns *Arabidopsis* növények segítségével sikerült bizonyítani, hogy mind a bZIP60-, mind a bZIP28-függő SA általi UPR génindukció NPR1-független útvonalon történik (1. ábra) (Nagashima és mtsai., 2014), azonban ez a folyamat még nem teljesen ismert. A tunikamicin (Tm) indukálta ER-stressz az NPR1 által szabályozott, a fehérje gátolja a bZIP60 és bZIP28 transzkripcionális szerepét (Lai és mtsai., 2018). Kimutatták, hogy *Arabidopsisban* a „constitutive expressor of pathogenesis-related genes” 5 (CPR) az SA negatív szabályzója (Bowling és mtsai., 1997). Ezen kívül az enzim a bZIP28 és a bZIP60 gátlására is képes, vagyis képes gátolni az UPR folyamatát az SA-befolyásolta növekedés érdekében (Meng és mtsai., 2017).

1.4. A GSH metabolizmusa

A glutation egy alacsony molekulásúlyú antioxidáns, mely fontos szerepet játszik a tiol-diszulfid interakciók során. A sejtek fő redox puffere, előfordul redukált (GSH) és oxidált (GSSG) formában is, azonban normál körülmények közt a citoszol alig tartalmaz GSSG-t (Meyer és mtsai., 2007; Gutscher és mtsai., 2008).

A glutation egy tripeptid, egy-egy Glu-Cys-Gly aminosavból épül fel, mely két lépésben keletkezik. Az elsőt a gamma-glutamilcisztein szintetáz (GSH1), a másodikat a glutation szintetáz (GSH2) enzim katalizálja (Noctor és mtsai., 2012). A molekula lebontása történhet citoplazmatikusan vagy extra-citoplazmatikusan (apoplaszt és vakuólum). A citoplazmatikus lebontás kulcsenzime a gamma-glutamil ciklotranszferáz (GGC) és az oxoprolináz (OXP1), mely az 5-oxoprolint bontja glutamáttá. A gamma-glutamil transzpeptidáz enzimek az apoplasztban (GGT1 and GGT2) és a vakuólumban (GGT4) találhatók. A két útvonal együtt és egyszerre is működhet, ugyanakkor vannak egyedi szerepeik és jellemzőik (Masi és mtsai., 2015; Uzilday és mtsai., 2017).

A glutation mennyiséget szabályzó enzimek közé tartozik a glutation reduktáz (GR), a dehidroaszorbát reduktáz (DHAR), a glutation transzferázok (GST) és a glutation peroxidázok (GPOX) (Mittler és mtsai., 2004). Ezek közül a GR és a DHAR az Asada-Halliwell-Foyer

ciklus szereplői, rendkívül fontosak a sejtek redox állapotának fenntartásában a glutation és aszkorbát homeosztázis fenntartásán keresztül (Noctor és mtsai., 2012). Az oxidált glutationt (GSSG) a glutation reduktáz (GR) képes redukálni NADPH segítségével, melynek eredményeként redukált glutation (GSH) keletkezik (Noctor és mtsai., 2012). A GST-k szerves peroxidok redukálásában és xenobiotikumok GSH konjugáció segítségével történő eltávolításában fontosak (Meyer és mtsai., 2012). *Arabidopsisban* eddig 53 GST-t azonosítottak, melyek különböző osztályokba sorolhatók. Ezek közül némelyek általánosan aktiválódnak a különböző stresszorokra, míg mások csak egy-egy specifikus hatásra érzékenyek (Sappl és mtsai., 2009). A növényi GPOX-ok fontosak a H_2O_2 és a lipid peroxidok semlegesítésében, emellett a növényi sejtek minden kompartmentumában megtalálhatók (Bela és mtsai., 2015). Általában a tioredoxint (TRX) használják redukálószerként, de néhány rendelkezik glutation és tioredoxin funkciókkal is (Herbette és mtsai., 2002; Uzilday és mtsai., 2017).

Redox érzékeny fluoreszcens fehérjék (roGFP) segítségével megállapították, hogy a GSH elektrokémiai redukciós potenciálja az ER-ben -208 mV, ami magasabb, mint a citoszolban mérhető, -300 mV-os érték. Ez az eredmény utal a GSH fontos redukáló képességére az ER-ben (Birk és mtsai., 2013). Emiatt a GSH-okozta redukció az oxidált, dimer forma kialakulását eredményezi (GSSG). Az oxidáció után a GSH-t a glutation reduktáz (GR) tudja regenerálni NADPH elektrondonor segítségével. A GR azonban hiányzik az ER-ből, emiatt itt a diszulfidhidak keletkezésének megfelelő, erősen oxidáló környezet jöhet létre (Ulrich és Jakob, 2019).

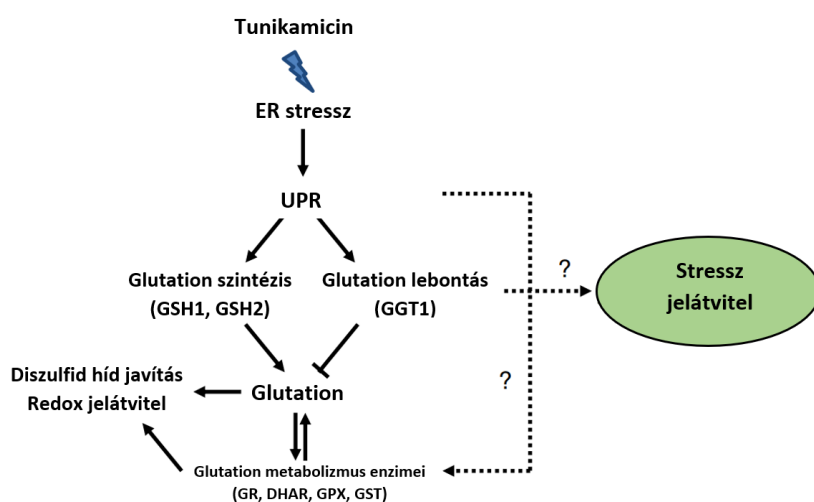
1.5. A GSH metabolizmusa és az ER-stressz

Az UPR folyamata során a hibás diszulfidhidak lebomlanak a redukált glutationok (GSH) segítségével az ER lumenében (Tu és Weissman, 2004). Emiatt hosszan tartó stressz során oxidálódhat a GSH készlet, ami befolyásolja a redox állapotot. A GSH-metabolizmus egyensúlya tehát rendkívül fontos az ER-ben a fehérjék keletkezésének szempontjából, erről azonban jelenleg még keveset tudunk a növények esetében (3. ábra). Az ER folyamataiban fontos szerepe lehet az aszkorbátnak és dehidroaszkorbátnak is (Gest és mtsai., 2013; Uzilday és mtsai., 2017).

ER-stressz hatására megnő a glutation bioszintézis gének aktivitása, ami emelkedett GSH szinteket eredményez *Arabidopsisban* (Uzilday és mtsai., 2017). Azonban emellett indukálódik a GGT1 által katalizált lebontó útvonal is, ennek ellenére a glutation szint emelkedik az apoptózisban. Ennek magyarázata, hogy az enzim szerepe a többlet apoptotikus GSSG lebontása lehet (Uzilday és mtsai., 2017). *Arabidopsis ggt1* hiánymutánsok vizsgálatával a

GGT1 jelátviteli funkcióját is megállapították. Ilyen esetekben az apoplaztban nem történik GSSG lebontás, a metabolit felhalmozódik és védekezési válaszok aktiválódnak (Tolin és mtsai., 2013). Az apoplasztikus változások és a sejten belüli, ER-ben történő stresszérzékelés közti kapcsolatot a gamma-glutamil ciklus és a NADPH-oxidázok (RBOHD és RBOHF) jelenthetik (Ozgur és mtsai., 2014). A ROS képződés az apoplaztban a glutation készlet oxidációját okozhatja, melynek lebontása érdekében aktiválódik a gamma-glutamil-ciklus. Az apoplasztikus glutation homeosztázis ROS általi változtatásával így az ER-stressz szintén alternatív jelátviteli utakat aktiválhat (Uzilday és mtsai., 2017).

A glutation homeosztázis meghatározásában a metabolitot szubsztrátként használó enzimeknek is nagy szerep jut. Az ER-stressz hatására fokozódik a GR, DHAR, GPOX és GST aktivitás is (Ozgur és mtsai., 2014). Különösen a GR aktivitása jelentős, ugyanis a GSSG redukálásával megőrzi a kellő GSH szinteket, mely a fehérjék hajtogatásához, illetve az emelkedett ERO1 aktivitás által keletkezett többlet H_2O_2 lebontásához fontos (Uzilday és mtsai., 2017).

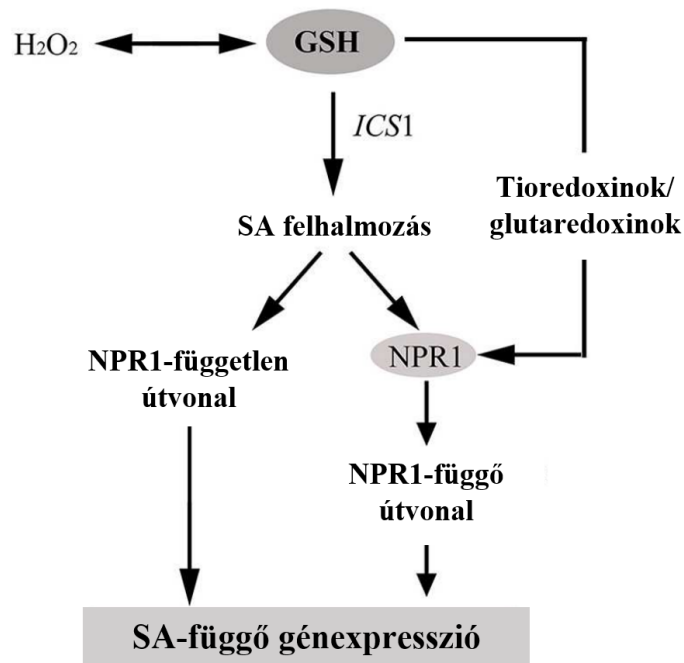


3. ábra: A glutation metabolizmusa az ER-stressz alatt *Arabidopsisban* (Uzilday és mtsai., 2017 alapján). BiP: „luminal binding protein”, DHAR: dehidroaszorbát reduktáz, GGT: gamma-glutamil transzpeptidáz, GPOX: glutation peroxidáz, GR: glutation reduktáz, GSH: glutation szintetáz, GST: glutation transzferáz, UPR: „unfolded protein response”.

1.6. A GSH és az SA

A növényi védekezési válaszokat kis molekulásúlyú fitohormonok, mint amilyen az SA, JA, ET vagy az abszcizinsav (ABA), jól szabályozott összejátéka alakítja ki. A hormonok közti kapcsolatok nem teljesen ismertek még, azonban sok bizonyíték utal a GSH fontos szerepére a különböző jelátviteli utak összekötése során (Datta és Chattopadhyay, 2018).

Az SA és GSH interakciójáról keveset tudunk ER-stressz alatt. Szintjeik közt a növényekben gyakran korreláció figyelhető meg. Az SA hatására növekszik a GSH szint, valamint a GSH: GSSG arány is (Srivastava és Dwivedi, 1998). A GSH a stresszválaszok fontos szabályzója. Szintjének szerepe van a H_2O_2 okozta levél léziók kialakulásában, az SA akkumulációjában, illetve ezen hormon és a JA közti interakcióban is (Mhamdi és mtsai., 2010). Az SA bioszintézisét az ICS1-en keresztül befolyásolja a GSH, a jelet a megemelkedett H_2O_2 szint szolgáltatja (4. ábra) (Han és mtsai., 2013; Datta és Chattopadhyay, 2018). A GSH-nak feltehetőleg van egy, közvetlenül az NPR1-et indukáló hatása is. Ezt az állítást nagyobb GSH tartalmú, transzgenikus dohány növényekkel bizonyították, ahol az NPR1 függő útvonal génjeinek (pl.: *PR1*, *glutamin szintetáz*) nagyobb aktivációját figyelték meg a vad típushoz képest. Az NPR1-független aktivációs útvonalon fekvő gének (pl.: *PR2*, *PR5*) expressziójában azonban nem figyeltek meg szignifikáns változást (Ghanta és mtsai., 2011).



4. ábra: A GSH és az SA kapcsolata (Datta és Chattopadhyay, 2018 alapján). GSH: redukált glutation, H_2O_2 : hidrogén-peroxid, ICS: izokorizimát szintáz, NPR: „non-expressor of pathogenesis-related genes”, SA: szalicilsav.

2. Célkitűzések

Kutatásaink célja az SA glutation metabolizmusára gyakorolt hatásának felderítése volt az ER-stressz során. Kísérleteinkhez *Solanum lycopersicum* L. cv. Ailsa Craig vad típusú és SA deficiens *NahG* paradicsom növényeket használtunk fel, melyeket 24 órás 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseknek vetettük alá. Munkánk során az alábbi főbb kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan hat az ER-stresszt indukáló Tm toxin a növényeinkre, illetve a kémiai chaperon PBA kezelés képes-e enyhíteni a Tm negatív hatását?
- Van-e a PBA-nak önmagában is hatása a növényekre?
- Mi történik, ha az ER-stressz mellett a növényeket exogén SA kezelésnek tesszük ki?
- Hogyan válaszolnak a növények az SA kezelésre, illetve hogyan befolyásolja ez a glutation metabolizmusát?
- Hogyan változik az ER-stressz- és az SA markergének expressziója a kezelések hatására a paradicsomnövények leveleiben 24 óra elteltével?
- Van-e különbség a reaktív oxigénformák mennyiségében a kezeléseket követően?
- Hogyan változnak a redukált és oxidált glutation szintek a különböző kezelések eredményeként?
- Hogyan alakítják a különböző kezelések a glutation metabolizmusban szerepet játszó főbb enzimek aktivitását?
- Vannak-e különbségek a glutation metabolizmusában szerepet játszó enzimeket kódoló gének expressziójában?
- Milyen változások következnek be a növények lipidperoxidációjában és ionkieresztésében a Tm, a PBA, illetve az SA kezelés és ezek kombinációinak hatására?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* L. cv. Ailsa Craig vad típusú és SA deficiens, transzgenikus szalicilsav-hidroxiláz gént kódoló *NahG* (Brading és mtsai., 2000) paradicsom növényeket használtunk. A csíráztatás 3 napon keresztül sötétben, 26°C-on történt. A növények kéthetes korukig perlitben, majd 6-8 hetes korukig hidropónikus kultúrában növekedtek. A tápoldat összetétele a következő volt: 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM KCl és a mikroelemek (10^{-6} M MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-7}$ M ZnSO_4 , 10^{-7} M CuSO_4 , 10^{-7} M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10^{-5} M H_3BO_4), $2 \cdot 10^{-5}$ M Fe-EDTA, pH 5,8. A növényeket 12 órás nappali/12 órás éjszakai periódus, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás (LED Plant Growing Shelves, Photo System Instruments, Drásov, Cseh Köztársaság), 24/22°C nappali/éjszakai hőmérséklet és 55-60 %-os relatív páratartalom mellett neveltük. A tápoldat cseréjét kétnaponta végeztük. A növények az 1 mM SA, valamint az $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és az 1 mM PBA kezelést a tápoldattal kapták, 24 órán keresztül. A Tm az N-glikolizáció gátlásával vált ki ER-stresszt (Faye és Chrispeels, 1989), a PBA egy kémiai chaperon, mely a fehérjék térszerkezetének kialakítását segíti (Watanabe és Lam, 2008). A kísérletekhez 7 hetes, 8 levélemeletes, virágzási stádiumban lévő növényeket kezeltünk. A vizsgálatokhoz a felülről számított harmadik levélemeletről származó, kifejlett leveleket használtuk. A mintavételeket és a kísérleteket 9 és 18 óra között, azonos időpontban végeztük és legalább 2 alkalommal ismételtük.

3.2. RNS izolálás, DNáz kezelés, cDNS írás, qRT-PCR

A növényekből származó összes RNS preparálásához kb. 500 mg mintát folyékony nitrogénben elhomogenizáltunk, és 1 ml TRI reagenst adtunk hozzá (1,82 M guanidinium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát (pH 4,0), 0,73 mM N-lauril-szarkozin, 45,45% fenol). A mintákat 65°C-on 3 percig inkubáltuk, majd 200 μl kloroformot adtunk hozzá, és 15 másodperces vortexelést követően 3 percig szobahőmérsékleten tartottuk. Centrifugálást követően (12000 g, 15 perc, 4°C) a felülúszót 375 μl kloroform: izoamilalkoholba (24:1) pipettáztuk át és 10 másodpercig vortexeltük. Újabb centrifugálás után (12000 g, 15 perc, 4°C) a mintákat 500 μl izopropanolba pipettáztuk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Lecentrifugáltuk őket (12000 g, 10 perc, 4°C), majd a pelletet 500 μl 70%-os hideg etanollal tisztítottuk. Ezt követően 30 μl dietil-pirokarbonáttal (DEP) kezelt steril desztillált vízben oldottuk fel az RNS-t (Chomczynski és Sacchi, 1987). A mintákat DNáz enzimmel kezeltük,

4 µl DNáz puffer, 17 µl DEP-es víz és 0,2 µl RNáz inhibitorhoz előbb 15µg RNS mintát, majd 4 µl DNáz enzimet adtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Az elegyet 37°C-on 30 percig, majd 65°C-on 10 percig inkubáltuk. A fehérjéket 150 µl kloroformmal és 150 µl fenollal távolítottuk el, majd a mintákat lecentrifugáltuk (12000 g, 15 perc, 4°C). A felülúszót tovább tisztítottuk 200 µl kloroformmal, centrifugáltuk (16000 g, 15 perc, 4°C), majd 550 µl hideg 96%-os etanol és 20 µl 3 M-os Na-acetát elegyében 2-3 órát inkubáltuk. Centrifugálást követően (16000 g, 15 perc, 4°C) 500 µl 70%-os hideg etanollal mostuk, majd 30 µl DEP-es vízben feloldottuk a pelletet. Az esetleges degradációt 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (Gallé, 2010). A tisztított RNS-t 200 U reverz transzkriptáz (RT) enzim (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) segítségével írtuk át cDNS-sé, 4 µl RT reakció puffer, 0,5 µl random hexamer, 1 µl 25 mM-os dNTP mix, 0,5 µl RNáz inhibitor, 13 µl DEP-es vizet tartalmazó reakcióelegyben. A reakció 37°C -on 1 órán át tartott (Gallé 2010). A vizsgálni kívánt gének expresszióját qRT-PCR segítségével detektáltuk. 18 µl szintetizált cDNS-t 342 µl nukleázmentes vízzel hígítottunk ki, majd ebből 1,6 µl hígított cDNS-tösszekevertünk 0,4 µl primerpárral 3 µl steril vízzel és 5 µl MAXIMA SYBR green qPCR master mixxel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A kísérletben használt primerek a függelékben találhatóak meg (1. melléklet; Gallé és mtsai., 2021; Islam és mtsai., 2017). A kvantitatív PCR-t (qRT-PCR) Real-Time PCR készülékkel (qTOWER 2.0 Analytik Jena, Jena, Németország) végeztük. A reakció során 10 percig 90°C-on történő hevítést egy 41 ciklusból álló sorozat (15 másodpercig 95°C, 1 percig 60°C) követett. A PCR lefutása után a termékek specifikusságát az olvadási görbék nyomonkövetésével ellenőriztük. Az adatok analíziséhez a $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ módszert alkalmaztuk. A paradicsom Elongációs-faktor-1-alfa (*SIEF1a*: R: 5'-GGAAGTTGAGAAGGAGCCTAAG-3'; F: 5'-CAACACCAACAGCAACAGTCT-3') értékeit használtuk referenciaként, ami mindvégig konstans expressziós szinteket mutatott a levelekben. Az eredményeket a vad típus kontroll eredményeire normalizáltuk (Gallé, 2010).

3.3. A szuperoxid-gyökanion kvantitatív meghatározása

A szuperoxid-gyökanion ($O_2^{\bullet-}$) meghatározásához (Sytykiewicz és mtsai., 2014) 100 mg mintát 1 ml dörzsölő pufferben (100 mM $Na_2HPO_4/NaHPO_4$ pH 7,2 pufferben oldott 1 mM nátrium-ditiokarbamát) homogenizáltunk jégen, majd centrifugálás után (13000 g, 15 perc, 4 °C) a felülúszót használtuk mintaként. A reakcióelegy tartalmazott 1 ml végtérfogatban 50 µl 12 mM-os „nitro blue tetrazolium”-ot és 300 µl felülúszót pufferrel kiegészítve. Spektrofotométerrel (Uvikon 930 spektrofotométer, Kontron AG, Eching, Németország) mérve meghatároztuk 540 nm hullámhosszon az 1 perc alatt bekövetkező abszorbancia változást.

3.4. A hidrogén-peroxid kvantitatív meghatározása

A H_2O_2 tartalom meghatározását Velikova és mtsai. (2000) módszere alapján végeztük. 200 mg friss növényi mintát 1 ml hideg 0,1 %-os triklórecetsavval (TCA) eldörzsöltünk, majd lecentrifugáltuk (12000 g, 10 perc, 4°C). 250 µl felülúszóhoz 250 µl 50 mM K-foszfátpuffert (pH 7) és 500 µl 1 M-os KI oldatot adtunk hozzá, majd összeráztuk és 10 perc után, 390 nm-en fotometráltuk az elegyet (KONTRON, Milánó, Olaszország). A H_2O_2 mennyiségét nmól g⁻¹ friss tömegre (FT) vonatkoztatva adtuk meg. A kalibrációt a H_2O_2 hígítási sorozatával készítettük.

3.5. A nem-enzimatis antioxiidáns tartalom meghatározása

Az glutation tartalmakat Horváth és mtsai. (2015) által módosított módszer alapján határoztuk meg. Körülbelül 100 mg növényi anyagot 0,4 ml 5% TCA-ban homogenizáltunk, majd centrifugálást (12000 g, 20 perc, 4 °C) követően a felülúszót használtuk a mérésekhez. Savas közegben a GSSG keletkezése minimális, így alkalmas ez az extraktum a kivonáskori redukált-oxidált molekula állapotok megőrzéséhez a mérések alatt. Az optikai denzitások meghatározásához minden esetben az Uvikon 930 spektrofotométert (Kontron AG, Eching, Németország), illetve plate olvasót (FLUOstar® Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) használtuk.

3.5.1. A glutation tartalom

A glutation tartalmak meghatározásához egy, a GR enzim használatán alapuló spektrofotometriás módszert használtunk (Griffith, 1980). Az össz glutation tartalom detektálásához közvetlenül a felülúszót használtuk, míg az oxidált forma (GSSG) mérésénél a felülúszóból vett mintát 2-vinilpiridinnel kezeltük, mely képes elfedni a redukált formát (GSH), 1 óra inkubációt követően trietanolaminnal semlegesítjük a vinilpiridint. A mérés 405 nm hullámhosszon detektált GR enzimaktivitás meghatározásán alapul, a reakció tartalmazott 0,2 mM NADPH-t, 0,25 mM 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesavat (DTNB), 20 µl kivonatot és 1 U GR enzimet (Baker's yeast; Sigma-Aldrich; St. Louis; USA) foszfát pufferben (0,1 M, pH 7,5) 1 ml végtérfogatban. A GSH mennyiségét az össz glutation és GSSG különbségéből számoltuk ki. A mennyiségeket 0,01-20 µM GSSG koncentrációs tartományban készített kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

3.6. A glutation metabolizmusával kapcsolatos enzimek aktivitásának meghatározása

Az antioxidáns enzimek aktivitásának meghatározásához körülbelül 200 mg növényi anyagot homogenizáltunk jégen 1 ml 100 mM foszfát pufferben (pH 7,0), melyhez hozzáadtunk 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF) és 1% polivinilpolipirrolidont (PVPP) a fehérjék védelmére, majd centrifugáltuk azt (12000 g, 20 perc, 4°C). A felülúszót használtuk tovább enzimaktivások mérésére, melynek fehérjetartalmát Bradford (1976) módszere alapján állapítottuk meg. Az enzimaktivások meghatározása minden esetben spektrofotometriás módszerrel történt az Uvikon 930 vagy Uvikon XL műszerek használatával (Kontron AG, Eching, Németország).

3.6.1. Glutation reduktáz (GR)

A reakció az enzim működése során keletkező GSH működésén alapul. A GSH DTNB-vel (5,5'-ditio-bis (2-nitro-benzoészav)) való reakciója során színes vegyület keletkezik, melynek fényelnyelését 412 nm hullámhosszon mérhetjük (Uvikon 930, Kontron AG, Eching, Németország). A reakcióelegy 600 µl foszfátpuffert (0,2 M, pH 7,0), 50 µl 2 mM-os NADPH-t, 50 µl 20 mM-os oxidált glutationt (GSSG), 50 µl enzimkivonatot és 250 µl 3 mM-os DTNB-t tartalmazott. A reakciót DTNB hozzáadásával indítottuk el (Smith és mtsai., 1988). Meghatároztuk az 1 perc alatt redukálódott DTNB mennyiségét és 1 mg fehérjére vonatkoztatva specifikus aktivitás értéket számoltunk ($\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.6.2. Dehidroaskorbát reduktáz (DHAR)

DHAR enzim aktivitását Edwards és Dixon (2005) módszere alapján végeztük el. A reakcióelegyben 100 mM foszfát pufferhez (pH 6,5) mértünk 0,5 mM dehidroaskorbátot és a reakciót 5 mM redukált glutationnal indítottuk. A 265 nm-en mért extinkció változásból az 1. és 2. perc közötti értékek felhasználásával számoltunk. $\epsilon_{265} = 14,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, az egy perc alatt keletkezett askorbátot µmol-ban megadva fejeztük ki az enzimegységet (U).

3.6.3. Glutation peroxidáz (GPOX)

A glutation peroxidáz (GPOX) aktivitást szintén Horváth és mtsai. (2015) által használt módszer alapján mértünk. A reakcióelegy tartalmazott 4 mM GSH-t, 0,2 mM NADPH-t, 0,05 U GR enzimet (Baker's yeast; Sigma-Aldrich; St. Louis; USA), 100 µl enzimkivonatot és 0,5 mM CHP szubsztrátot 100 mM foszfát pufferben (pH 7,0) 1 ml végtérfogatban. A NADPH fogyást 340 nm-en detektáltuk, és minden esetben korrigáltuk az értékeket a szubsztrátot nem tartalmazó reakcióelegy mérésével, hogy kiküszöböljük a nem specifikus NADPH oxidációt. 1 U az az aktivitás, ami 1 perc alatt 1 nmól NADPH oxidációjára képes, $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6.4. Glutation transzferáz (GST)

A glutation transzferáz (GST) aktivitást egy mesterséges szubsztrát, az 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) segítségével határoztuk meg, a korábban leírt módszer alapján (Horváth és mtsai., 2015). A reakcióelegy tartalmazott 1 mM GSH-t, 100 µl enzim kivonatot és 1 mM CDNB szubsztrátot 100 mM foszfát pufferben (pH 6,5) 1 ml végtérfogatban. Ezt követően 340 nm-en mértük a CDNB-GS konjugátumok képződését. 1 U-nak határoztuk meg azt az aktivitást, amely 1 perc alatt 1 nmól konjugátum előállítására képes, $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7. A lipidperoxidáció mértékének meghatározása

A lipidperoxidáció mértékének megállapításához a folyamat egyik végtermékének, a malondialdehydnek (MDA) a mennyiségét mértük meg, tiobarbitursavval való reakciójuk alapján (Ederli és mtsai., 1997). 100 mg növényi anyagot először folyékony nitrogénben porítottunk, majd 1 ml 0,1% TCA-val homogenizáltuk, a további lipidperoxidáció megakadályozására 100 µl 4% butilált hidroxitoluolt (BHT) adtunk hozzá, és végül centrifugáltuk (12000 g, 20 perc, 4 °C). 0,25 ml felülúszóhoz 1 ml tiobarbitursav/TCA keverékét adtunk (0,5%/20%), majd 30 percig inkubáltuk 98°C -on blokk termosztátban, majd egységesen 1,5 ml-re egészítettük ki. Az abszorbanciát 532 nm-en mértük, amit a 600 nm-nél mért nem specifikus értékkel korrigáltunk (Uvikon 930 spektrofotométer, Kontron AG, Eching, Németország). Az MDA koncentrációt $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficienssel (ϵ) számoltuk, melyet friss tömegre vonatkoztattunk.

3.8. Az életképesség meghatározása – elektrolit kieresztés (EL) mérése

A növények életképességét az elektrolit kieresztés alapján Sun és mtsai. (2010) módszere segítségével határoztuk meg. Három darab 1 cm átmérőjű levélkorongot tettünk kezelésenként 20 ml ioncserélt desztillált vízbe 2 órára, 25 °C-on, sötétben. Az inkubáció után meghatároztuk az oldat vezetőképességét (C1) konduktivitásmérővel (HANNA Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA). A mintákat ezután 40 percig forraltuk, majd lehűtés után ismét meghatároztuk az oldat konduktivitását (C2). A relatív elektrolit kieresztést a következő képlettel számoltuk: Relatív elektrolit kieresztés = $(C1/C2) \times 100$.

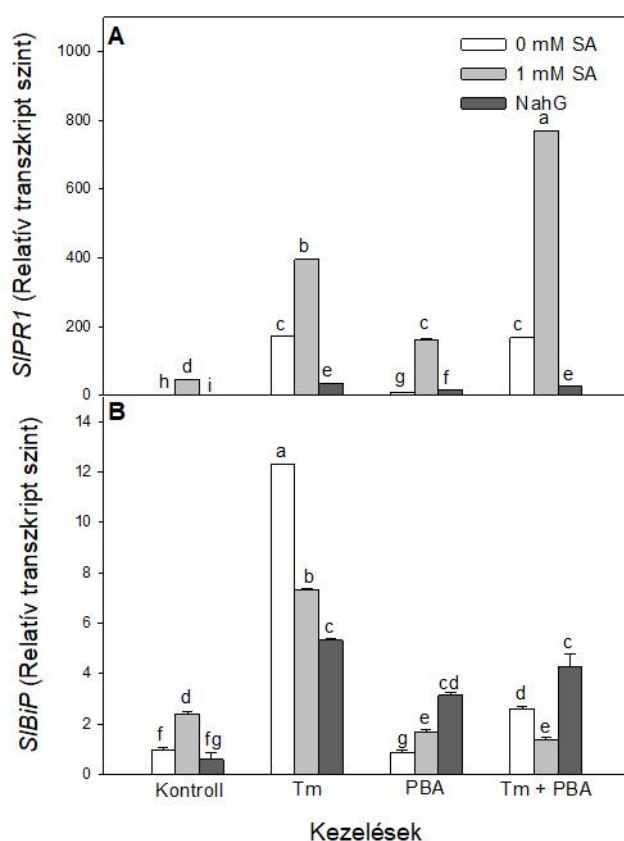
3.9. Az adatok feldolgozása és értékelése

A mért adatokat Microsoft Office Excel 2007 program és SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) programok segítségével dolgoztuk fel és értékeltük ki. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket a varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelölt átlagok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten különböznek egymástól szignifikánsan.

4. Eredmények

4.1. A markergének expressziójának változása

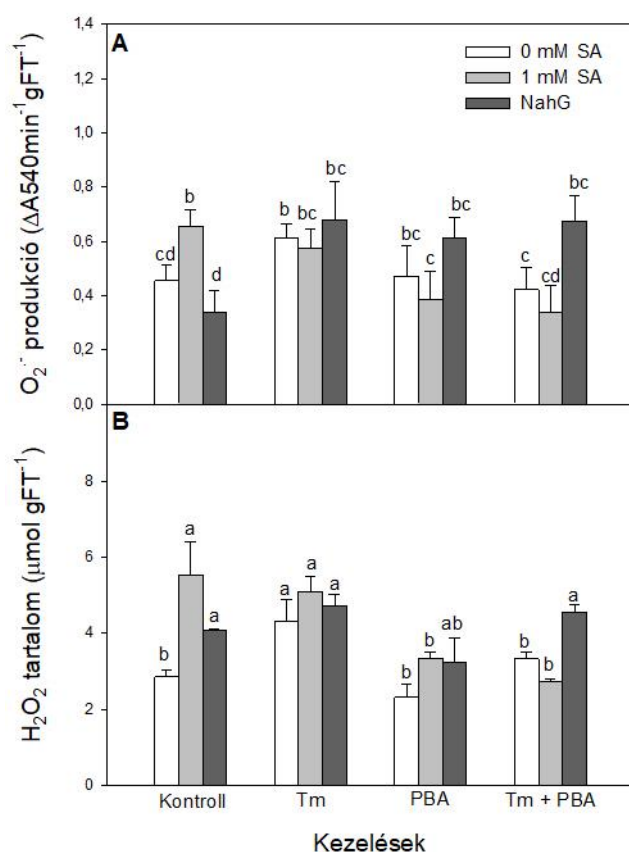
Méréseink során elsőként az SA jelátvitel markergénjének, a *PR1*-nek (5/A ábra), illetve az ER-stresszben kulcsszerepet ellátó *BiP* (5/B ábra) expresszióját vizsgáltuk. Vad típusú növények esetén csak a PBA kémiai chaperon hatására figyeltünk meg relatív expresszió csökkenést, minden más esetben növekedés történt mindkét gén esetében. Az extra SA kezelés hatására minden esetben *PR1* indukciót mértünk, mely a Tm+PBA-kezelt növények esetén volt a legmagasabb (5/A ábra). A *BiP* esetében az ER-stresszt kiváltó Tm kezelés hatására történt erős indukciót a SA képes volt csökkenteni, ez kisebb mértékben Tm+PBA kezelésnél is megvalósult. A másik két esetben az SA tovább növelte az expressziót (5/B ábra). Az SA hiányos *NahG* mutáns növények kezelés hatására expresszió növekedést mutattak a kontroll körülményekhez képest, mely általában alacsonyabb volt, mint a vad típusú növényekben mért, kivéve *BiP*-nél, ahol a PBA, valamint Tm+PBA kezelés esetén meghaladta azt (5/B ábra).



5. ábra: Az *SIPR1* (A) és *SIBiP* (B) relatív transzkript szintjének változása 24 órás 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és *NahG* paradicsom növények levelében (Átlag+SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

4.2. A reaktív oxigénformák produkciójának változása

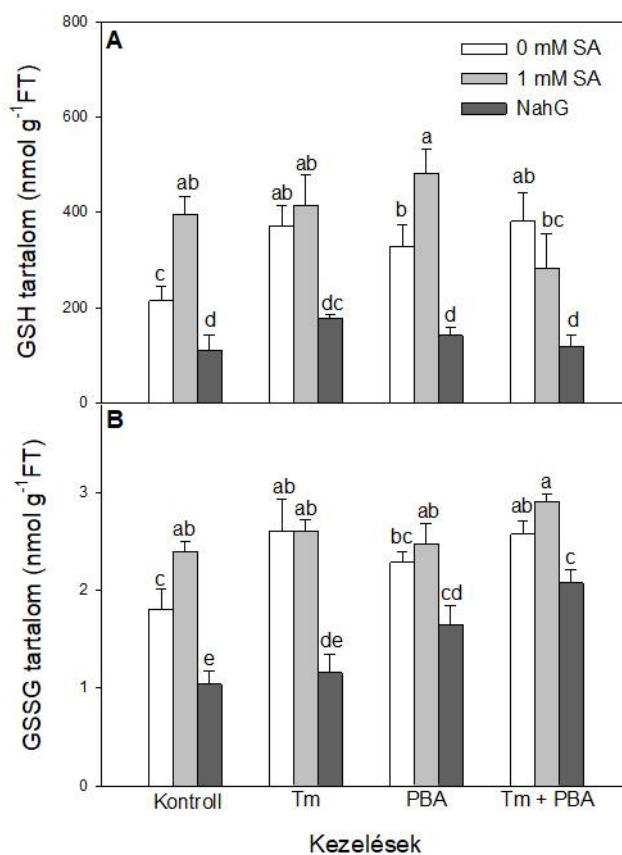
A reaktív oxigénformák közül a szuperoxid gyökkanion (6/A ábra) és a hidrogén-peroxid szintjeinek változásait követtük nyomon (6/B ábra). A Tm és a SA kontroll körülmények közt növelték ezek szintjét a levelekben. A *NahG* mutáns növényeknél a szuperoxid produkció minden kezelés hatására növekedett a kontrollhoz képest (6/A ábra). A H_2O_2 tartalom a kontroll, illetve Tm+PBA kezelt *NahG* növényeknél magasabb volt a vad típushoz képest (6/A ábra).



6. ábra: A szuperoxid (A) és hidrogén-peroxid (B) tartalom változása 24 órás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és *NahG* paradicsom növények levelében (Átlag+SE, $n=5$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

4.3. A glutation mennyiségének változása

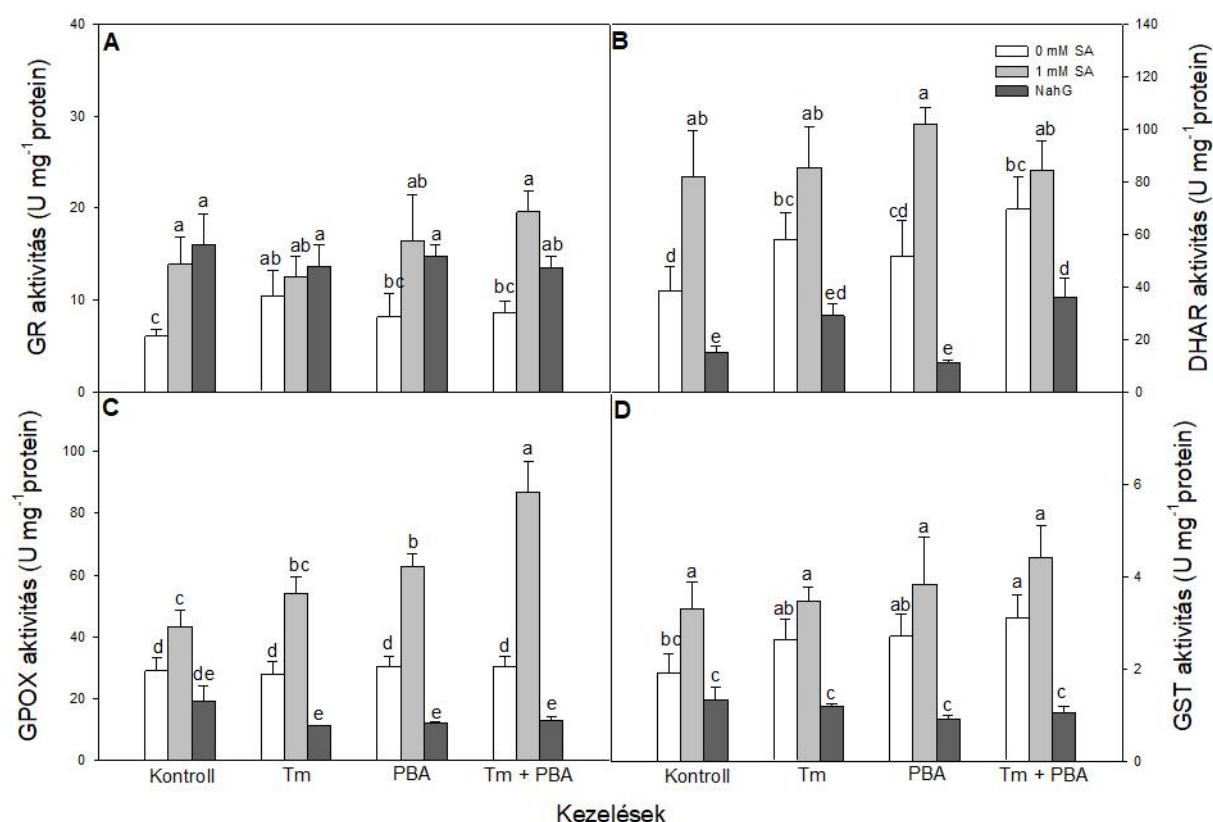
Vad típusú növényekben a kezelések hatására növekedtek a GSH (7/A ábra), valamint GSSG (7/B ábra) értékek is a 24. órában. Ezt az SA a GSH esetén a kontroll, illetve PBA-kezelt növények levelében tovább növelte (7/A ábra). A GSSG esetén csak kontroll körülmények közt történt hasonló változás (7/B ábra). A *NahG* növényekben majdnem minden esetben szignifikánsan alacsonyabb GSH és GSSG tartalmakat mértünk a vad típusúakhoz képest. Esetükben a GSSG tartalom PBA, valamint Tm+PBA kezelések esetén volt magasabb a kontroll értékeknél (7/B ábra).



7. ábra: A glutation tartalmak (A: GSH; B: GSSG) változása 24 órás 5 µg ml⁻¹ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és *NahG* paradicsom növények levelében (Átlag+SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok P ≤ 0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

4.4. A glutation metabolizmusban szerepet játszó enzimek aktivitásának változása

Az ER-stressz során kulcsszereppel bíró glutation metabolizmusát is megvizsgáltuk. Míg az ezt kiváltó Tm kezelés csak kismértékben befolyásolta a glutation metabolizmusában szerepet játszó kulcsenzimek, a GR (8/A ábra), a DHAR (8/B ábra), a GPOX (8/C ábra) és a GST (8/D ábra) aktivitását, addig az SA kezelés jelentősebb mértékben növelte azokat. A GPOX esetén a növekedés még szignifikánsabb volt a kombinált kezelések esetén. Összességében az SA deficiens *NahG* növényekben általában alacsonyabb enzimaktivitásokat mértünk a vad típusú növényekhez képest, a GR enzim kivételével.



8. ábra: A glutation metabolizmusban szerepet játszó enzimek (A) glutation reduktáz (GR), (B) dehidroaskorbát reduktáz (DHAR), (C) glutation peroxidáz (GPOX), (D) glutation transzferáz (GST) változása 24 órás 5 µg ml⁻¹ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és *NahG* paradicsom növények levelében (Átlag+SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

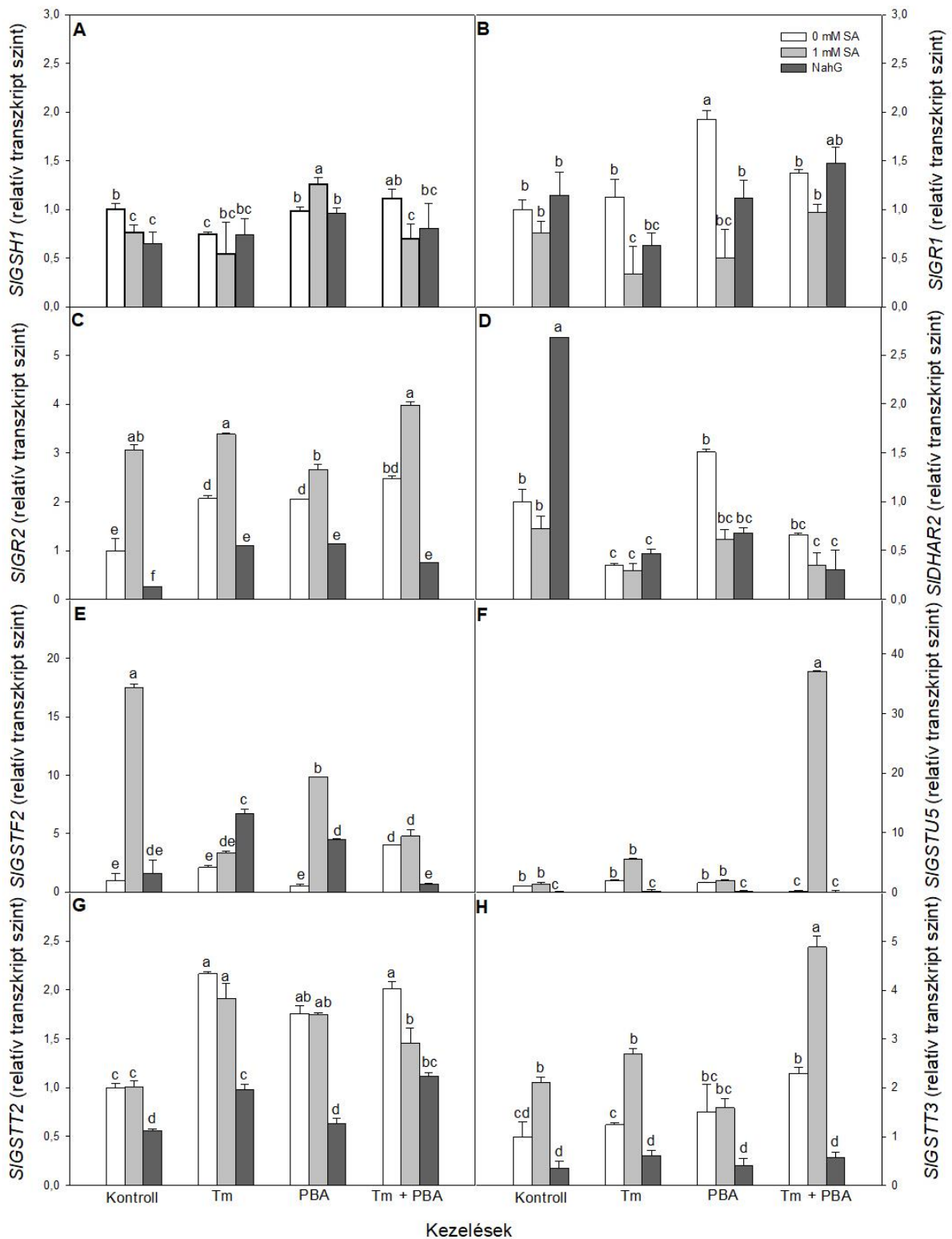
4.5. A glutation metabolizmusában szerepet játszó főbb enzimeket kódoló gének transzkripció változása

A glutation bioszintézisében szerepet játszó *SIGSH1* expressziója csökkent a Tm kezelés hatására paradicsomban (9/A ábra). Az SA kezelés kontroll és Tm+PBA kezelés mellett csökkentette az indukció mértékét a vad típushoz képest, míg a PBA chaperon mellett növelte azt. A kontrollhoz képest a PBA kezelés esetén mértük a legmagasabb értékeket. A *NahG* növények kontroll körülmények közt alacsonyabb expressziót mutattak a vad típusúakhoz képest, csak a PBA kezelés hatására történt szignifikáns növekedés.

Az oxidált glutationok lebontásában a GR játszik fontos szerepet. Az *SIGR1* esetén a PBA kezelésre nőtt meg a gén expressziója (9/B ábra), az *SIGR2* esetén minden kezelés hatására (9/C ábra). Az extra szalicilsav képes volt gátolni a Tm és PBA kezelést kapó növények *SIGR1* expresszióját, ez a Tm esetén alacsonyabb volt a kontrollnál. Az *SIGR2* gén kifejeződése az SA hatására emelkedett. A *NahG* mutáns növények minden kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb *SIGR2* expressziót mutattak a vad típushoz képest, az *SIGR1* esetén csak a PBA kezelés után volt ez megfigyelhető. Az *SIGR2* esetén a kezelt növényekben szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a kezeletlen kontrollhoz képest.

Az *SIDHAR2* expresszió a Tm hatására csökkent a vad típusú kontroll növényekhez képest. Az SA kezelés hatására a kontrollhoz képest a Tm és a Tm+PBA kezelések esetén mértünk csökkenést. A *NahG* növényekben szignifikánsan magasabb aktivációt mértünk a kontroll körülmények közt, mely nagy mértékben meghaladta a kezeléseknél mért értékeket (9/D ábra).

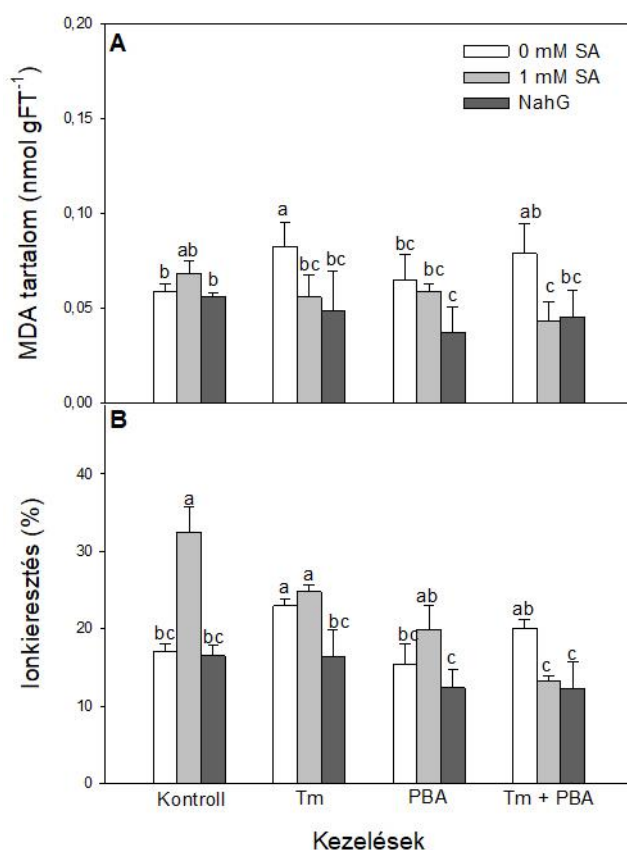
A GST-k közül négy gén aktivitását követtük nyomon. Vad típusú növényeknél a Tm+PBA kezelés okozott magasabb génindukciókat. Az SA hatására indukciót mértünk *SIGSTF2* gén esetén kontroll körülmények közt, valamint a PBA kezelés hatására is (9/E ábra), míg az *SIGSTU5* esetén a Tm+PBA (9/F ábra), az *SIGSTT3* esetén pedig a PBA-n kívül minden kezelést követően (9/H ábra). A hormon hatására csökkent az expresszió a Tm+PBA kezelésnél az *SIGSTT2* gén esetében (9/G ábra). A kontrollhoz képest szignifikáns indukció történt az *SIGSTU5* és az *SIGSTT3* géneknél a Tm+PBA kezelések hatására. Az *SIGSTF2* esetén csökkenések történtek, a PBA esetén mérsékeltebb módon. Az *SIGSTT2* gént is indukciók jellemezték a kezelésekre az SA mellett a kontrollhoz viszonyítva. A *NahG* növények általában szignifikánsan alacsonyabb GST bioszintézishez kapcsolt génexpressziókat mutattak a vad típusúakhoz képest. Ez alól az *SIGSTF2* kivétel, ahol a Tm és PBA hatására is jelentősebb expressziókat mértünk. Itt a Tm és PBA, illetve az *SIGSTT2* esetén a Tm és Tm+PBA kezeléseknél a kontrollnál magasabb értékeket mutattunk ki.



9. ábra: A glutation metabolizmusban szerepet játszó gének (A) gamma-glutamilsztein szintetáz (*SGSH1*), (B) glutation reduktáz 1 (*SGR1*), (C) glutation reduktáz 2 (*SGR2*), (D) dehidroaszorbát reduktáz 2 (*SIDHAR2*), (E) glutation transzferáz F2 (*SGSTF2*), (F) glutation transzferáz U5 (*SGSTU5*), (G) glutation transzferáz T2 (*SGSTT2*), (H) glutation transzferáz T3 (*SGSTT3*) változása 24 órás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és *NahG* paradicsom növények levelében (Átlag+SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

4.6. A lipidperoxidáció és az életképesség változása

A növényi membránok integritását az ionkieresztés meghatározásának módszerével, a lipidperoxidációt az MDA tartalom változása alapján vizsgáltuk. Az oxidatív stresszt kiváltó Tm hatására mindkét esetben magasabb értékeket mértünk a kontrollhoz képest (10. ábra). A Tm+PBA kezeléseknél az SA hatására csökkenést mértünk a vad típusú növényekhez viszonyítva. Az ionkieresztés mértékét az SA kontroll körülmények közt növelte (10/B ábra), míg a Tm kezelés mellett csökkentette az MDA tartalmat (10/A ábra). A kontrollhoz képest a hormon mellett a Tm+PBA kezelésnél csökkent az ionkieresztés, valamint az MDA mennyisége is. NahG paradicsomok esetén mindkét vizsgálatnál a Tm kezelések szignifikánsan alacsonyabb értékeket eredményeztek a vad típusúakhoz képest.



10. ábra: Ionkieresztés (A) és malondialdehid tartalmak (B) változása 24 órás 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA, valamint 1 mM SA kezeléseket követően vad típusú és NahG paradicsom növények levelében (Átlag+SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-teszt alapján.

5. Eredmények értékelése

A növényeket érő stresszhatások eredményeként az endoplazmatikus retikulumban rosszul hajtogatott fehérjék halmozódnak fel, ezek védekezési válaszokat indítanak el, melyeket UPR-nek nevezünk (Liu és Howell, 2016). Az ekkor lejátszódó folyamatok szabályzásában fontos szerepet játszik az SA, valamint a glutation metabolismusának különböző enzimek is (Ozgur és mtsai., 2018). Ahhoz, hogy az ER-ben lejátszódó változásokat megvizsgálhassuk SA kezelés mellett Tm segítségével ER-stresszt váltottunk ki, melyet PBA kémiai chaperon segítségével próbáltuk enyhíteni. A mérésekhez Ailsa Craig vad típusú, illetve transzgenikus szalicilsav-hidroxiláz gént kódoló, emiatt szalicilsav felhalmozásra képtelen (Brading és mtsai., 2000) *NahG* paradicsom növények leveleit használtunk.

Az *SLPR1* gén expressziójából kitűnik, hogy valóban indukálódik az SA kezelések hatására (Fan és Dong, 2002; Pandey és Somssich, 2009). A képződött fehérje szterol kötő aktivitása révén képes támadni a patogéneket (Saleem és mtsai., 2021). A gén indukcióját az ER-stresszt kiváltó Tm is elindítja, vagyis a *PR* gének aktivációjában az UPR-nek is lehet szerepe, ezt alátámasztja, hogy a *BiP* indukció megelőzi a *PR1* akkumulációt (Wang és mtsai., 2005). *Arabidopsis*-ban megfigyelték, hogy a *PR* gének indukciója az UPR IRE1 útvonalán át is megtörténik (Moreno és mtsai., 2012). Számunkra meglepő módon az *NahG* növényekben kis mértékben, de indukálódott a vizsgált gén, ez az ET és a JA miatt lehet, melyek szintén részt vesznek az ER-stresszben (Czékus és mtsai., 2020; Czékus és mtsai., 2022). Az *SIBiP* expressziója a vártan megfelelően Tm kezelés hatására volt a legmagasabb. A *BiP* dajkafehérje, feladata, hogy biztosítsa a fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakulását, illetve az UPR elindításában is szerepet játszik (Otero és mtsai., 2010). Expressziójának növekedése az ER-stressz kialakulását jelzi (Srivastrava és mtsai., 2014). Eredményeink alapján a PBA kémiai chaperon hatékonyan mérsékelte a stresszt, de nem volt képes teljesen „kezelnit” azt a Tm kezelés mellett. A Tm kezelés mellett az SA képes volt mérsékelni a *BiP* expressziót, ennek oka lehet, hogy az UPR jelátviteltől függetlenül az NPR1-indukálta *PR* gének kezelik a stressz okozta változások egy részét (Mou és mtsai., 2003; Poór és mtsai., 2019).

A szuperoxid és hidrogén-peroxid produkció Tm kezelés alatti növekedése oxidatív stresszt okozott paradicsom levelében, mások méréséhez hasonlóan (Ozgur és mtsai., 2018). Hasonló előidézésére a redox jelátvitel és az antioxidáns védelmi rendszer szabályzásában kulcsszerepet játszó SA is képes (Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011; Poór és mtsai., 2019), azonban érdekes, hogy ez csak kontroll körülmények közt történt meg, az ER-stressz kezelése

mellett nem történtek változások. A ROS emelkedett szintje miatt megváltozik a növények redox státusza, mely antioxidáns rendszerek aktiválódását eredményezi (Ozgur és mtsai., 2014).

A glutation szintek a kezelések hatására általában szignifikánsan emelkedtek. Ennek magyarázata a molekula stresszkezelésben elengedhetetlen szerepe (Meyer és mtsai., 2007; Noctor és mtsai., 2012). A GSH fontos a megfelelő redox állapot fenntartásához, illetve a rosszul hajtogatott fehérjék redukálásához, melyek mennyisége nő stressz során (Meyer és mtsai., 2007; Noctor és mtsai., 2012). Az SA hiányos *NahG* növények végig alacsonyabb glutation szinteket mutattak, vagyis az SA a GSH fontos regulátora. A hormon nélkül nem szintetizálódik elegendő glutation a rosszul hajtogatott fehérjék lebontására, ez más úton kell megtörténjen, ami magyarázhatja az SA deficiens növények magasabb *BiP* expresszióját a kezelések hatására.

Az ER-stressz csak kis mértékben befolyásolja a glutation metabolizmushoz köthető enzimek aktivitását (Uzilday és mtsai., 2017). Az SA kezelésre sokkal nagyobb aktivitásokat mértünk, ez is bizonyítja a hormon és a GSH szoros kapcsolatát a növényekben. Ezt megerősíti, hogy általában a mutáns növényink is alacsonyabb enzimaktivitást mutattak.

Eredményeink alapján a glutation szintézist végző *SlGSH1* génnek nem mutattak magas transzkript változásokat, vagyis a glutation szintek növekedése inkább a katabolizmus gátlásából fakadhatott, melyet azonban nem vizsgáltunk részletesen. Korábbi kísérletek során az apoplasztikus GGT1 lebontó útvonal emelkedett aktivitását figyelték meg az ER-stressz alatt. Ez akár különböző jelátviteli folyamatok elindításában is szerepet játszhat, azonban ennek megértéséhez további vizsgálatokra van szükség (Uzilday és mtsai., 2017). A glutation reduktáz enzimek NADPH redukáló ágens segítségével képesek átalakítani a GSSG-t GSH-vá, így biztosítva a két molekula megfelelő arányát a sejtekben (Noctor és mtsai., 2012), mely a fehérjék hajtogatásához, illetve az emelkedett PDI-ERO1 aktivitás által keletkezett többlet H_2O_2 lebontásához fontos (Ozgur és mtsai., 2014). Érdekes módon mind az SA, mind a Tm kezelés inkább az *SlGR2* expresszióját befolyásolta, növelve azt, bár a mutáns növényeké végig alacsonyabb maradt. Ezzel szemben az *SlGR1* esetén az SA hatására a Tm és a PBA kezelésre is inkább a gén gátlása volt megfigyelhető. A DHAR2 az aszkorbát-glutation ciklus fontos enzime. A folyamat H_2O_2 lebontást végez, mely során a GSH dehidroaszkorbát redukálásával képes regenerálni az aszkorbátot. Mindez a DHAR2 enzim segítségével valósul meg (Ding és mtsai., 2020). A Tm hatására az *SlDHAR2* expresszió csökkent, erre a GSH ER-stresszben betöltött szerepe miatt lehetett szükség. Kontroll körülmények közt a gén a *NahG* mutáns

növényekben kiugró aktivitást mutatott, azaz normál körülmények közt az aktivitás meghatározásában az SA-nak fontos szerepe lehet.

A glutation transzferázoknak a redox egyensúly fenntartásában, illetve xenobiotikumok eltávolításában van szerepük (Meyer és mtsai., 2012). Emellett kulcsfontosságúak a különböző biotikus és abiotikus stresszválaszok szabályzásában is (Islam és mtsai., 2017). A vizsgálatainkhoz előzetesen kiválasztott glutation metabolizmushoz kapcsolódó és GST gének SA kezelésekre és különböző gombafertőzésekre (pl. *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*) is szignifikáns expressziót mutattak (Gallé és mtsai., 2021; Islam és mtsai., 2017). A GST-k expresszióját az *SLGSTT2* kivételével nemigen befolyásolták az ER-stresszre ható kezeléseink. Az SA ismételten nagyobb hatással volt ezekre, ami a mutánsok jellemzően alacsonyabb expresszióját látva a hormon és GSH metabolizmus erős összefüggését mutatja.

A lipidperoxidáció kiváltó oka az oxidatív stressz. A folyamat során a membránok telítetlen foszfolipid molekuláit oxigén szabadgyökök támadják, az oxidáció során lipid szabadgyökök képződnek, melyek különböző, a biomolekulákat károsító láncreakciókat indítanak el (Catalá, 2010). Az MDA mértékét a Tm, valamint a Tm+PBA kezelése emelték, mely azt bizonyítja, hogy a PBA nem képes megbirkózni az ER-stresszel, csupán enyhíti azt. Az ionkieresztés mértéke is nőtt Tm kezelésre, vagyis ez csökkentette a növények életképességét. Emellett az SA is növelte az EL-t, melynek oka a HR kialakulása lehetett (Velásquez és mtsai., 2018).

Összefoglalva az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az ER-stressz folyamatában az SA által szabályozott glutation metabolizmusának kulcsszerepe van.

6. Irodalomjegyzék

- Aller, I.; Meyer, A. J. (2013). The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma*, 250(4): 799-816.
- Attacha, S.; Solbach, D.; Bela, K.; Moseler, A.; Wagner, S.; Schwarzländer, M.; Aller, I.; Müller, S. J.; Meyer, A. J. (2017). Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Env.*, 40(8): 1281-1295.
- Bela, K.; Horváth, E.; Gallé, Á.; Szabados, L.; Tari, I.; Csiszár, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J. Plant Physiol.*, 176: 192-201.
- Birk, J.; Meyer, M.; Aller, I.; Hansen, H. G.; Odermatt, A.; Dick, T. P.; Meyer, A. J.; Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: Reduced and oxidized glutathione revisited. *J. Cell Sci.*, 126: 1604-1617.
- Bowling, S. A.; Clarke, J. D.; Liu, Y.; Klessig, D. F.; Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9(9): 1573-1584.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254.
- Brading, P. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Parr, A.; Jones, J. D. (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2-and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.*, 23(3): 305-318.
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke, J. D.; Volko, S.; Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1): 57-63.
- Cao, J.; Wang, C.; Hao, N.; Fujiwara, T.; Wu, T. (2022). Endoplasmic reticulum stress and reactive oxygen species in plants. *Antioxidants*, 11(7): 1240.
- Catalá, A. (2010). A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399(3): 318-323.
- Chen, Y.; Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.*, 23(11): 547-555.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1): 156-159.
- Czékus, Z.; Csíkos, O.; Ördög, A.; Tari, I.; Poór, P. (2020). Effects of jasmonic acid in ER stress and unfolded protein response in tomato plants. *Biomolecules*, 10(7): 1031.
- Czékus, Z.; Szalai, G.; Tari, I.; Khan, M. I. R.; Poór, P. (2022). Role of ethylene in ER stress and the unfolded protein response in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 181: 1-11.
- Datta, R.; Chattopadhyay, S. (2018). Glutathione as a crucial modulator of phytohormone signalling during pathogen defence in plants. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, 84: 581-597.
- Dempsey, D. M. A.; Vlot, A. C.; Wildermuth, M. C.; Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/ASPB.*, 9.
- Ding, H.; Wang, B.; Han, Y.; Li, S. (2020). The pivotal function of dehydroascorbate reductase in glutathione homeostasis in plants. *J. Exp. Bot.*, 71(12): 3405-3416.
- Ding, P.; Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends Plant Sci.*, 25(6): 549-565.
- Ding, Y.; Sun, T.; Ao, K.; Peng, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, 173(6): 1454-1467.

- Durner, J.; Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(24): 11312-11316.
- Ederli, L.; Pasqualini, S.; Batini, P.; Antonielli, M. (1997). Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *J. Plant Physiol.*, 151(4): 422-428.
- Edwards, R.; Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Meth. Enzymol.*, 401: 169-186.
- Fan, W.; Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14(6): 1377-1389.
- Faye, L.; Chrispeels, M. J. (1989). Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion. *Plant Physiol.*, 89(3): 845-851.
- Gallé, Á. (2010). Búzafajták ozmotikus- és szárazságstressz alatti akklimatizációja, a glutation transzferázok szerepe a stresszválaszban. Doktori (PhD) értekezés, SZTE
- Gallé, Á.; Bela, K.; Hajnal, Á.; Faragó, N.; Horváth, E.; Horváth, M.; Puskás, L.; Csiszár, J. (2021). Crosstalk between the redox signalling and the detoxification: GSTs under redox control? *Plant Physiol. Biochem.*, 169: 149-159.
- Gest, N.; Gautier, H.; Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64: 33-53.
- Ghanta, S.; Bhattacharyya, D.; Sinha, R.; Banerjee, A.; Chattopadhyay, S. (2011). *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. *Planta* 233: 895-910.
- Goodman, R. N.; Novacky, A. J. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. *APS*.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106(1): 207-212.
- Gutscher, M.; Pauleau, A. L.; Marty, L.; Brach, T.; Wabnitz, G. H.; Samstag, Y.; Meyer A. J.; Dick, T. P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods*, 5(6): 553-559.
- Herbette, S.; Lenne, C.; Leblanc, N.; Julien, J. L.; Drevet, J. R.; Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2414-2420.
- Herrera-Vásquez, A.; Carvallo, L.; Blanco, F.; Tobar, M.; Villarroel-Candia, E.; Vicente-Carbajosa, J.; Salinas, P.; Holuigue, L. (2015). Transcriptional control of glutaredoxin *GRXC9* expression by a salicylic acid-dependent and NPR1-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 33(3): 624-637.
- Herrera-Vásquez, A.; Salinas, P.; Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.*, 6: 171.
- Holuigue, L.; Salinas, P.; Blanco, F.; Garretón, V. (2007). Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht, 197-246.
- Horváth, E.; Bela, K.; Papdi, Cs.; Gallé, Á.; Szabados, L.; Tari, I.; Csiszár, J. (2015). The role of *Arabidopsis* glutathione transferase *F9* gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biol. Hung.*, 66: 406-418.
- Howell, S. H. (2013). Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64: 477-499.

- Islam, S.; Rahman, I. A.; Islam, T.; Ghosh, A. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PloS One*, 12(11): e0187504.
- Iwata, Y.; Fedoroff, N. V.; Koizumi, N. (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell*, 20(11): 3107-3121.
- Iwata, Y.; Koizumi, N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.*, 17(12): 720-727.
- Janda, T.; Szalai, G.; Pál, M. (2020). Salicylic acid signalling in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(7): 2655.
- Johnson, C.; Boden, E.; Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15(8): 1846-1858.
- Kneeshaw, S.; Gelineau, S.; Tada, Y.; Loake, G. J.; Spoel, S. H. (2014). Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Mol. Cell*, 56(1): 153-162.
- Lai, Y. S.; Renna, L.; Yarema, J.; Ruberti, C.; He, S. Y.; Brandizzi, F. (2018). Salicylic acid-independent role of NPR1 is required for protection from proteotoxic stress in the plant endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 115(22): 5203-5212.
- Lee, S.; Kim, S. G.; Park, C. M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 188(2): 626-637.
- Lefevre, H.; Bauters, L.; Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.*, 11: 338.
- Li, Y.; Williams, B.; Dickman, M. (2017). *Arabidopsis* B-cell lymphoma2 (Bcl-2)- associated athanogene 7 (BAG7)-mediated heat tolerance requires translocation, sumoylation and binding to WRKY29. *New Phytol.*, 214: 695-705.
- Liu, J. X.; Howell, S. H. (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(3): 782-796.
- Liu, J. X.; Howell, S. H. (2016). Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytol.*, 211(2): 418-428.
- Margis, R.; Dunand, C.; Teixeira, F. K.; Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family-an evolutionary overview. *FEBS J.*, 275(15): 3959-3970.
- Masi, A.; Trentin, A. R.; Agrawal, G. K.; Rakwal, R. (2015). Gamma-glutamyl cycle in plants: a bridge connecting the environment to the plant cell? *Front. Plant Sci.*, 6: 252.
- Meng, Z.; Ruberti, C.; Gong, Z.; Brandizzi, F. (2017). CPR 5 modulates salicylic acid and the unfolded protein response to manage tradeoffs between plant growth and stress responses. *Plant J.*, 89(3): 486-501.
- Meyer, A. J.; Brach, T.; Marty, L.; Kreye, S.; Rouhier, N.; Jacquot, J. P.; Hell, R. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.*, 52(5): 973-986.
- Meyer, A. J.; Dreyer, A.; Ugalde, J. M.; Feitosa-Araujo, E.; Dietz, K. J.; Schwarzländer, M. (2021). Shifting paradigms and novel players in Cys-based redox regulation and ROS signaling in plants-and where to go next. *Biol. Chem.*, 402(3): 399-423.
- Meyer, A. J.; Riemer, J.; Rouhier, N. (2019). Oxidative protein folding: state-of-the-art and current avenues of research in plants, *New Phytol.*, 221: 1230-1246.
- Meyer, Y.; Belin, C.; Delorme-Hinoux, V.; Reichheld, J. P.; Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.*, 17: 1124-1160.

- Mhamdi, A.; Hager, J.; Chaouch, S.; Queval, G.; Han, Y.; Taconnat, L.; Saindrenan, P.; Gouia, H.; Issakidis-Bourguet, E.; Renou, J.-P.; Noctor, G. (2010). *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol.*, 153: 1144-1160.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci.*, 22(1): 11-19.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9(10): 490-498.
- Miura, K.; Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, 5: 4.
- Moreno, A. A.; Mukhtar, M. S.; Blanco, F.; Boatwright, J. L.; Moreno, I.; Jordan, M. R.; Chen, Y.; Brandizzi, F.; Dong, X.; Orellana, A.; Pajeroska-Mukhtar, K. M. (2012). IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS One*, 7(2): e31944.
- Mou, Z.; Fan, W.; Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7): 935-944.
- Nagashima, Y.; Iwata, Y.; Ashida, M.; Mishiba, K. I.; Koizumi, N. (2014). Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 55(10): 1772-1778.
- Nagashima, Y.; Mishiba, K. I.; Suzuki, E.; Shimada, Y.; Iwata, Y.; Koizumi, N. (2011). *Arabidopsis* IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci. Rep.*, 1: 29.
- Nawkar, G. M.; Lee, E. S.; Shelake, R. M.; Park, J. H.; Ryu, S. W.; Kang, C. H.; Lee, S. Y. (2018). Activation of the transducers of unfolded protein response in plants. *Front. Plant Sci.*, 9: 214.
- Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y. I.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell Env.*, 35: 454-484.
- Oikawa, D.; Kimata, Y.; Kohno, K.; Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res.*, 315(15): 2496-2504.
- Otero, J. H.; Lizák, B.; Hendershot, L. M. (2010). Life and death of BiP substrate. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20: 472-478.
- Ozgun, R.; Turkan, I.; Uzilday, B.; Sekmen, A. H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 65(5): 1377-1390.
- Ozgun, R.; Uzilday, B.; Iwata, Y.; Koizumi, N.; Turkan, I. (2018). Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo. *J. Exp. Bot.*, 69(14): 3333-3345.
- Pandey, S. P.; Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.*, 150(4): 1648-1655.
- Pollard, M. G.; Travers, K. J.; Weissman, J. S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell*, 1(2): 171-182.
- Poór, P.; Czékus, Z.; Tari, I.; Ördög, A. (2019). The Multifaceted Roles of Hormone Salicylic Acid in Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 5842.
- Raskin, I.; Skubatz, H.; Tang, W.; Meeuse, B. J. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Ann. Bot.*, 66(4): 369-373.
- Rivas-San Vicente, M.; Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.*, 62(10): 3321-3338.

- Saleem, M.; Fariduddin, Q.; Castroverde, C. D. M. (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol. Biochem.*, 168: 381-397.
- Saleh, A.; Withers, J.; Mohan, R.; Marqués, J.; Gu, Y.; Yan, S.; Zavaliev, R.; Nomoto, M.; Tada, Y.; Dong, X. (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host Microbe*, 18(2): 169-182.
- Sappl, P. G.; Carroll, A. J.; Clifton, R.; Lister, R.; Whelan, J.; Harvey Millar, A.; Singh, K. B. (2009). The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.*, 58(1): 53-68.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7): 2883-2894.
- Seyfferth, C.; Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front. Plant Sci.*, 5: 697.
- Shamu, C. E.; Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.*, 15(12): 3028-3039.
- Singh, A.; Lim, G. H.; Kachroo, P. (2017). Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *J. Integr. Plant Biol.*, 59(5): 336-344.
- Smith, I. K.; Vierheller, T. L.; Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.*, 175(2): 408-413.
- Spoel, S. H.; Loake, G. J. (2011). Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14(4): 358-364.
- Srivastava, M. K.; Dwivedi, U. N. (1998). Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *J. Plant Physiol.*, 153(3-4): 409-414.
- Srivastava, R.; Chen, Y.; Deng, Y.; Brandizzi, F.; Howell, S. H. (2012). Elements proximal to and within the transmembrane domain mediate the organelle-to-organelle movement of bZIP28 under ER stress conditions. *Plant J.*, 70: 1033-1042.
- Srivastava, R.; Deng, Y.; Howell, S. H. (2014). Stress sensing in plants by an ER stress sensor/transducer, bZIP28. *Front. Plant Sci.*, 5: 59.
- Sun, J.; Li, L.; Liu, M.; Wang, M.; Ding, M.; Deng, S.; Lu, K.; Zhou, X.; Shen, X.; Zheng, X.; Chen, S. (2010). Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K⁺/Na⁺ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 103(2): 205-215.
- Sytykiewicz, H.; Chrzanowski, G.; Czerniewicz, P.; Sprawka, I.; Łukasik, I.; Goławska, S.; Sempruch, C. (2014). Expression profiling of selected glutathione transferase genes in *Zea mays* (L.) seedlings infested with cereal aphids. *PLoS One*, 9(11): e111863.
- Tolin, S.; Arrigoni, G.; Trentin, A. R.; Veljovic-Jovanovic, S.; Pivato, M.; Zechman, B.; Masi, A. (2013). Biochemical and quantitative proteomics investigations in *Arabidopsis ggt1* mutant leaves reveal a role for the gamma-glutamyl cycle in plant's adaptation to environment. *Proteomics*, 13: 2031-2045.
- Tu, B. P.; Weissman, J. S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* 164: 341-346.
- Ulrich, K.; Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 140: 14-27.
- Urade, R. (2019). Oxidative protein folding in the plant endoplasmic reticulum. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 83(5): 781-793.
- Uzilday, B.; Ozgur, R.; Sekmen, A. H.; Turkan, I. (2017). Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.*, 45(2): 284-296.

- Velásquez, A. C.; Castroverde, C. D. M.; He, S. Y. (2018). Plant-pathogen warfare under changing climate conditions. *Curr. Biol.*, 28(10): 619-634.
- Velikova, V.; Yordanov, I.; Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151(1): 59-66.
- Vlot, A. C.; Dempsey, D. M. A.; Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 47: 177-206.
- Wang, D.; Weaver, N. D.; Kesarwani, M.; Dong, X. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Sci.*, 308(5724): 1036-1040.
- Watanabe, N.; Lam, E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 283(6): 3200-3210.
- Xu, C.; Bailly-Maitre, B.; Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.*, 115: 2656-2664.
- Yang, D. L.; Yang, Y.; He, Z. (2013). Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol. Plant*, 6(3): 675-685.
- Zhang, L.; Zhang, C.; Wang, A. (2016). Divergence and conservation of the major UPR branch IRE1-bZIP signaling pathway across eukaryotes. *Sci. Rep.* 6: 27362.
- Zhang, X.; Chen, S.; Mou, Z. (2010). Nuclear localization of NPR1 is required for regulation of salicylate tolerance, isochorismate synthase 1 expression and salicylate accumulation in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.*, 167(2): 144-148.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Fehér Attilának, a Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy a munkámhoz szükséges kísérleteket a Növénybiológiai Tanszéken végezhettem.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Poór Péternek, a dolgozat elkészítéséhez nyújtott minden tanácsáért, szakmai iránymutatásáért és biztatásáért.

Szeretném megköszönni Czékus Zalának a fáradhatatlan segítségét a különböző módszerek ismertetésében.

Szeretném külön megköszönni Koprivanacz Péternek és Papp Rebekának a kísérletek megvalósításában nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom a Növénybiológiai Tanszék laboránsainak Bécs Attiláné Etának, Porkoláb Erzsébetnek, Kapásné Török Évának és Dóri Erikának a laborokban szükséges alapvető tudásért és segítségért, amit munkám során tőlük kaptam.

Óriási köszönet jár családomnak és barátaimnak, akik mindig támogattak és ott voltak, amikor szükségem volt rájuk.

Végezetül köszönöm a kísérletek elvégzéséhez a pályázatok (NFÖ, OTKA FK 124871 és 138867) anyagi támogatásait.

8. Függelék

1. melléklet: A génexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált paradicsom primerek.

Primerek			
Gén neve és azonosítója		Bal primer (5'-3')	Jobb primer (5'-3')
<i>SIPR1</i>	Solyc01g106620	CCCCAGCACCAGAATGAAT	CATCCCGAGCACAAAACATG
<i>SIBiP</i>	Solyc08g082820	GCTTCCACCAACAAGAACAAT	TCAGAAAGACAATGGGACCTG
<i>SIGSH1</i>	Solyc08g081010	CTGCGACCCATGAAGTATGA	TGCTTTGCTTTCCCTGTTTC
<i>SIGR1</i>	Solyc09g065900	TTCGGAATTGCCTTCACTTATT	GTTGTACTGAGCTTTGGTGAGC
<i>SIGR2</i>	Solyc09g091840	TGGTGCGATTTTGT TTTTGT	TCTGTTGGTCCTCACAAACG
<i>SIDHAR2</i>	Solyc05g054760	TTCCTACCTTCGTCTCATTTCTG	AACAAACATTCTGCCCATG
<i>SIGSTF1</i>	Solyc02g081340	CGGAACGACATTGGAAGAA	CTCCAACCTCCTCGTATTCCCT
<i>SIGSTF2</i>	Solyc06g009020	TGAAAGGAAGGGGGAACAAT	TTTTGCTTTGTGGTGTGCTC
<i>SIGSTT2</i>	Solyc08g080900	GGTGAGTTCGTCGGAGTTAATT	CGAGAAGGTTGGGACATACG
<i>SIGSTT3</i>	Solyc08g080910	TGAAGTGGCTTGATGATACGA	TACAATCAACCCTCGCTGG
<i>SIGSTU5</i>	Solyc01g086680	CCCTCTTGCCTAAACATCCA	TCTCCCTTTCTTCTCCTTTGC
<i>SIGSTU34</i>	Solyc09g011540	TGGAGCAAAAGAGAGAAAAA	GCAGCAACATCAACAAATCC

9. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Milodanovic Dávid** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **A szalicilsav hatása a glutation metabolizmusára ER-stressz alatt** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
A növények nevelése	4
A növények bekezelése	4
Mintavétel	4
Minták feldolgozása	4
H ₂ O ₂ és O ₂ ^{•-} mérés	5
Glutation tartalmak mérése	4
Enzim aktivitás mérése	4
RNS kivonás, cDNS írás	4
qPCR	5
Eredmények értékelése	5

Kelt.: Szeged, 2022. november 13.

Milodanovic Dávid

Pályamunkát benyújtó hallgató (Milodanovic Dávid) aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Poór Péter

Témavezető (Dr. Poór Péter, SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék) aláírása