

37. OTDK Biológia Szekció

Lúdfű gyökerek redox potenciáljának *in vivo* vizsgálata
tranziens kifejeződésű roGFP2 redox próbával

Jász Krisztián Sándor

Biológus MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők:

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán

Dr. Horváth Edit

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1 A növények gyökérrendszerét meghatározó főbb tényezők.....	3
2.1.1. A gyökérrendszer fejlődésének főbb hormonális tényezői.....	3
2.1.2. A gyökérrendszer fejlődésének exogén tényezői.....	4
2.1.3. A ROS szerepe a gyökérfejlődésben.....	5
2.2. A sejtek redox állapota.....	7
2.2.1. A redox állapotot meghatározó endogén tényezők.....	7
2.2.2. A redox állapot változása stressz hatására.....	9
2.2.3. Az <i>in vivo</i> redox állapot meghatározása roGFP2 konstrukció használatával.....	9
2.3. A roGFP2 konstrukció bejuttatása növényekbe.....	11
2.3.1. Az <i>Agrobacterium tumefaciens</i> segítségével.....	11
2.3.2. A <i>Rhizobium rhizogenes</i> használata genetikai transzformációra.....	13
3. Célkitűzés.....	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1. A kísérleti növény.....	16
4.2. Az <i>Arabidopsis thaliana</i> magok steril körülmények közötti csíráztatása.....	16
4.3. A transzformációhoz használt plazmid konstrukció és baktérium törzsek.....	17
4.4. Tápoldatok/táptalajok.....	18
4.4.1. Növényi táptalajok.....	18
4.4.2. Baktérium tenyésztésénél használt táptalaj.....	19
4.5. A növények transzformálása.....	20
4.6. A transzformáns gyökerek ellenőrzése.....	21
4.7. Redox állapot megállapítása ozmotikus stressz hatása mellett.....	21
4.7.1. Konfokális fluoreszcens mikroszkópos analízis.....	21
4.7.2. Ozmotikus- és sóstressz redox potenciálra kifejtett hatásának vizsgálata.....	22
4.7.3. A redox potenciál számolása.....	22
4.8. Statisztikai analízis.....	23
5. Eredmények és értékelésük.....	24
5.1 Az ozmotikus stressz hatás vizsgálata a roGFP2-t <i>R. rhizogenes</i> -közvetítette transzformációval kifejeztetett gyökereken.....	24
5.2. A kezelések hatását jól nyomon lehetett követni a roGFP2 fluoreszcencia detektálásával.....	24
5.3. Ozmotikus stressz kezelés hatásának vizsgálata a roGFP2-t <i>R. rhizogenes</i> -közvetítette transzformációval kifejeztetett egyhetes gyökerek ozmotikumot tartalmazó táptalajra helyezése után 5 nappal.....	26
5.4. Ozmotikus stressz kezelés hatásának vizsgálata az <i>A. tumefaciens</i> segítségével bejuttatott roGFP2-t kifejező transzformánsokkal a magvak táptalajra helyezése után 5 nappal.....	28
5.5. A <i>R. rhizogenes</i> és az <i>A. tumefaciens</i> által bejuttatott roGFP2 használatával kapott eredmények összehasonlítása.....	28
6. Összefoglaló.....	31
7. Köszönetnyilvánítás.....	32
8. Irodalomjegyzék.....	33
9. Tételes szerzői hozzájárulás.....	36

1. Bevezetés

A gyökér többek közt a növények számára szükséges víz és a benne oldott tápelemek felvételéért felelős. Kapcsolatot hoz létre a növény és a rhizoszféra között. A gyökérrendszert számos endogén és exogén hatás éri, amely annak változását okozza. A növények érzékelik a különböző hatásokat és bizonyos mértékig tudnak alkalmazkodni. Az extrém mértékű vagy hosszabb ideig tartó hatás károsító lehet. Azt a környezeti tényezőt, ami a korábbi homeosztázistól eltérő állapotot hoz létre stresszornak hívjuk, míg a megváltozott állapotot stressznek nevezzük (*Selye 1956*). A stressz rövid távon okozhat akut károsodást, ami nagyrészt a sejtben megnövekedett reaktív oxigén formákon (ROS) keresztül történik meg. Ezeket a molekulákat antioxidánsok semlegesítik, megvédve ezzel a sejtet. Amennyiben a ROS szint annyira megnő, hogy az antioxidánsok nem képesek megbirkózni vele, a sejt membránjaiban, fehérjeiben és DNS-ében károk keletkeznek, aminek eredményeként a sejt el is pusztulhat. Stressz hatásokra a ROS szint mellett az antioxidáns rendszer is változik, és tágabb értelemben az antioxidánsok a homeosztázist hivatottak fenntartani. Az elmúlt évtizedben a stressz szemlélet változása következtében a figyelem központjába került a sejtek redukciós-oxidációs (redox) állapota (*Potters és mtsai. 2010*). A redox állapot a sejtek oxidáló és redukáló molekuláinak az összességéből adódik össze. A stresszorok képesek megváltoztatni a redox állapotot a ROS mennyiségének növelésével, ekkor a sejtek oxidáltabb állapotba kerülnek. Azonban ez a ROS formák direkt átalakítása mellett, jelátviteli folyamatokon keresztül génexpressziós változásokat elindítva a homeosztázis visszaállítását szolgáló válaszreakciókat vált ki. A sejtek, szövetek redox állapotában bekövetkező változások azonban igen gyorsak és nehezen követhetők. Legpontosabb képet *in situ* módszerekkel kaphatunk, és azon belül is nagy jelentőségű a genetikailag kódolt redox próbák használata. Kísérleteink során a redox szenzitív zöld fluoreszcens proteint (roGFP2) használtuk a gyökér redox állapot változásának *in vivo* vizsgálatára. Célunk volt a citoplazmában kifejeződő génkonstrukció növénybe juttatására a *Rhizobium rhizogenes* (korábbi neve: *Agrobacterium rhizogenes*) alkalmazása, illetve az így kifejeztetett redox próba használata. A *R. rhizogenes* talajban élő baktérium, amely a növény sérülése esetén fertőzhet. A sérülés helyén hajszálgökeresedést okoz, ami olyan gyökerek képződését eredményezi, amelyek exogén hormonhatástól függetlenül nőnek és genetikailag stabilak. Fontos tulajdonságuk, hogy transzformálás után nagy mennyiségben fejeztethetnek ki a növénnel rokon- és idegen fajok anyagcsere termékeit is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A növények gyökérrendszerét meghatározó főbb tényezők

2.1.1. A gyökérrendszer fejlődésének főbb hormonális tényezői

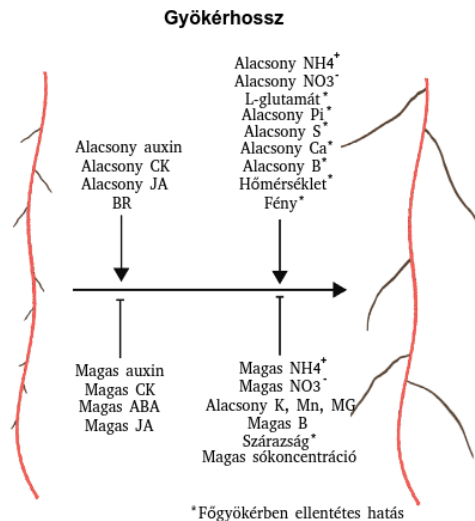
A gyökérrendszer fejlődésében nélkülözhetetlen szerepet játszanak a hormonok. Közülük az egyik legfontosabb az auxin, amely egy széles körű hatással rendelkező hormon. A biológiai hatást kiváltó fő molekula az indol-3-ecetsav (*Fehér és mtsai. 2019*). Az auxin által szabályozott gének promóterében auxin response element (AuxRE) található, ezekhez auxin válasz faktorok (ARF) kapcsolódnak. Auxin hiányában az ARF-okhoz represszor fehérjék kapcsolódnak, gátolva ezzel a működésüket. A gyökérrendszerre kifejtett egyik legfontosabb hatása, hogy a főgyökér növekedését serkenti. Emellett a gyökerek elágazásáért is felelős, a ciklin dependens kinázok és a ciklin D gének szabályozásával a sejtosztódást szabályozza (*Khan és mtsai. 2016*). Az auxin a járulékos gyökerek kialakulását az oldalgyökerek fejlődéséhez hasonlóan szabályozza (*Bellini és mtsai. 2014*). Emellett az auxin felelős a sejtek megnyúlásáért, differenciálódásáért és a gyökérmerisztéma működéséért (*Fehér és mtsai. 2019*). A citokininek az auxinnal kölcsönhatásban hajtásban általánosan serkentik a sejtosztódást. Viszont gyökerekben sok esetben gátolják a sejtosztódást, illetve a differenciálódást elősegítve a merisztéma sejtjeinek számát csökkentik, az oldalgyökerek megnyúlásos növekedését gátolhatják, a járulékos- és oldalgyökerek fejlődését gátolják. Az oldalgyökerek elongációját koncentrációtól függően gátolják; kisebb koncentrációban csak a gyökérrendszer proximális régiójában gátolnak (*Bellini és mtsai. 2014, Waidmann és mtsai. 2020*). Az abszcizinsav az ozmotikus stressz hatására halmozódik fel. Fokozza a gyökerek vízfelvételét, szárazságstressz alatt a főgyökér növekedését serkenti, míg az oldalgyökerek növekedését gátolja. A főgyökerek növekedését koncentrációtól függően szabályozza. Kisebb koncentrációban az auxin PIN2 transzporterén keresztül serkenti a növekedést, magas koncentrációja azonban gátolja a nyugalmi sejtek és a gyökér proximális merisztémájának osztódását (*Fehér és mtsai. 2019*). A brasszinoszteroidok koncentráció függő módon szabályozzák a gyökerek fejlődését. Magas koncentrációban gátolják, kis koncentrációban serkentik a gyökér elongációját. A nyugalmi sejtek identitását őrzik a disztális kolumella sejtek differenciálódásának szabályozásával (*Fehér és mtsai. 2019*).

2.1.2. A gyökérrendszer fejlődésének exogén tényezői

A gyökerek fejlődését hormonok mellett a különböző környezeti faktorok is befolyásolják (1. ábra). Ezek lehetnek biotikus és abiotikus hatások.

Az abiotikus tényezők közé tartoznak a tápelemek. Az aminosavak és proteinek előállításához elengedhetetlen a nitrogén. Ezt az elemet a gyökerek szerves és szervetlen formában is képesek felvenni. Ammónium hatására a főgyökér növekedése gátlódik, míg az oldalgyökerek növekedése és elágazása megnő. Viszont magas nitrát koncentráció hatására az oldalgyökerek megnyúlása lecsökken, alacsony koncentrációban pedig serkenti azt (*Waidmann és mtsai. 2020*). A szervetlen foszfát az egyedüli foszfor forrás a talajban, immobilis elem, ami egyenetlen eloszlást és alacsony szintet okoz, ezért a növények fejlődésében gyorsan limitáló faktorrá válik. Foszfát hiányhoz a növények nagy része rövidebb főgyökérrel és hosszú sűrű oldalgyökérral alkalmazkodnak. Így képesek jobban felfedezni a talaj felső rétegét, ahol a szervetlen foszfát akkumulálódik. Ráadásul mikorrhizák segítségével a foszfát felszívás javul. Vannak olyan fajok, amik proteoid gyökereket növesztenek, ezek foszfátázok és savak segítségével szolubilis formába alakítják a foszfátokat. A foszfát hiányhoz hasonlóan a kalcium hiány is sekély, sűrű gyökérzet fejlődését váltja ki (*Bellini és mtsai. 2014*).

A tápelemek mellett a víz elérhetősége is nagyban befolyásolja a gyökérzet fejlődését. Hideg, fagy, szárazság és magas sókoncentráció hatására vízhiány, a növényben ozmotikus stressz alakulhat ki. Vízhiány során a növények a talaj mélyebb rétegeit tárják fel talajvíz után kutatva. Ezt úgy érik el, hogy a főgyökér meghosszabbodik, az oldalgyökerek fejlődése gátlódik, a főgyökér a nedves talaj irányába növekszik, amit hidrotropizmusnak neveznek. Az abszcizinsav a korábban leírt módon szabályozza a gyökerek fejlődését vízhiány esetén. Az oldalgyökerek növekedésének gátlása a MYB96 transzkripciós faktoron keresztül történik (*Waidmann és mtsai. 2020*).



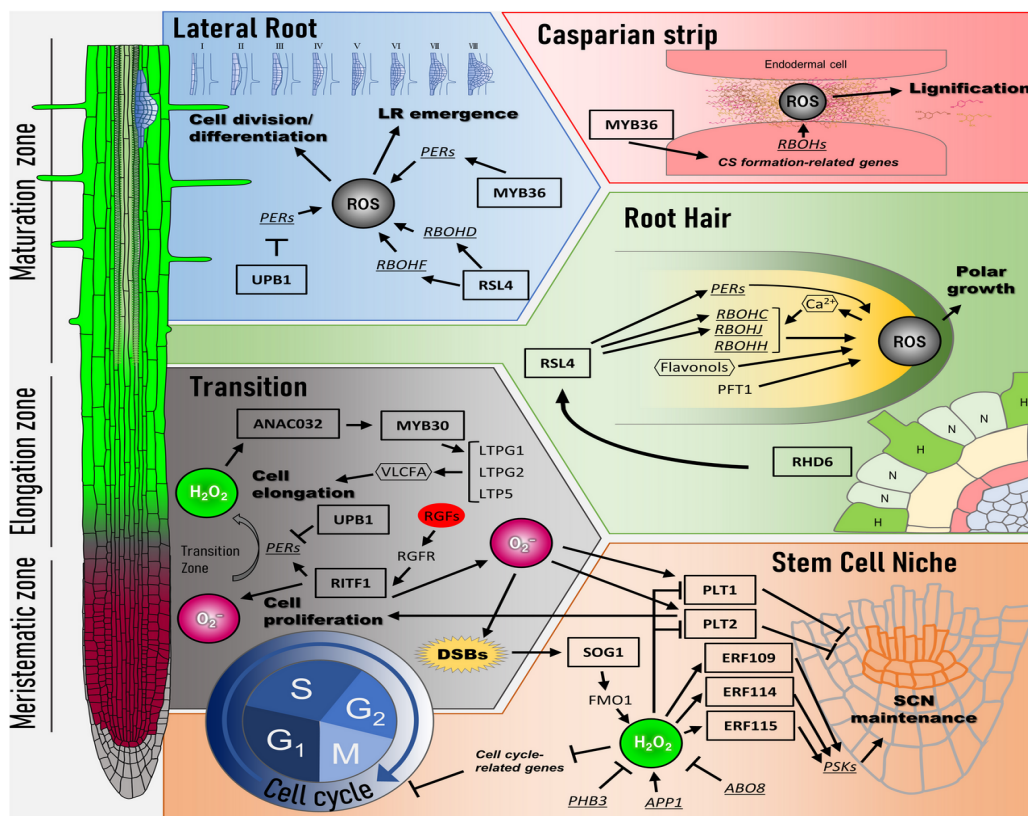
1. Ábra: Az oldalgyökerek fejlődésére különböző környezeti tényezők hatnak. Az ábrán a nyilak serkentést, a tompa nyilak gátlást jeleznek. A csillagozott tényezők a főgyökérben ellentétes hatást vált ki (Waidmann és mtsai. 2020).

A környezet élettelen hatásai mellett a növényeket különböző patogének és növényevők is károsítják, ezt biotikus stressznek nevezik. A kórokozók számtalan tünetet képesek előidézni a gazdáikban. Ilyen a nekrózis, baktériumoknál az idegen anyag megjelenése a növény belsejében vagy a kórokozók megjelenése a növényen. A növényevők nem csak mechanikai sérüléseket okoznak, hanem patogének vektoraiként is működhetnek. Ezekkel szemben a növényekben több védekezési módszer is kialakult. Patogének ellen a legalapvetőbb védelmük a hiperszenzitív reakció (HR). A HR során a növényi sejt receptorokon keresztül felismeri a patogént, kalcium-ionok jutnak be a sejtbe, ez aktiválja a kalcium dependens kinázokat. A NADPH oxidáz aktiválódik, megnövelve a ROS szintet. A HR miatt a fertőzés helyén és a fertőzés körül elhalnak a sejtek, kiéheztetve a patogéneket és egy erősen oxidatív környezetbe helyezik őket (Balint-Kurti 2019).

2.1.3. A ROS szerepe a gyökérfejlődésben

A ROS számos módon befolyásolja a gyökerek fejlődését (2. ábra, Mase és Tsukagoshi 2021). A gyökércsúcsban a ROS gradienstől függ, hogy a sejtek osztódnak vagy differenciálódásra váltanak. A O_2^- az osztódási zónában gyülemlik fel, míg a H_2O_2 a megnyúlási zónában. Ezt az egyensúlyt az UPBEAT1 (UPB1) transzkripciós faktor tartja fent a peroxidázok kifejeződésének gátlásával a megnyúlási zónában (Tsukagoshi és mtsai. 2010). A ROS-on

keresztül a sejt képes a sejtfal szilárdságát is módosítani. A peroxidázok képesek H_2O_2 -ot termelni O_2 -ből, majd ebből hidroxil-gyök ($\cdot\text{OH}$) keletkezik. A hidroxil-gyök képes pektint és hemicellulózokat hasítani, fellazítva ezzel a sejtfalat. Ez az elongációs zónában a sejt megnyúlásához elengedhetetlen (*Kärkönen és Kuchitsu 2015*). A Caspary-csík képződésében is fontos szerepet játszik a ROS. A MYB36 transzkripciós faktor pozitívan szabályozza a NADPH-oxidázokat (RBOH), amik az extracelluláris térben megnövelik a ROS-szintet, ez oxidatíván polimerizálja a monolignol molekulákat ligninné (*Kamiya és mtsai. 2015*). Az oldalgyökerek fejlődésében is szerepet játszanak. Az UPB1 transzkripciós faktor, ami a peroxidázokat gátolja, gátlódik és a peroxidázok megnövelik a ROS szintjét az oldalgyökérben. A MYB36 fenntartja a ROS egyensúlyt a periciklusban, ez segíti a gyökér primordium alakjának változását peroxidáz gének szabályozásával (*Manzano és mtsai. 2014*). A gyökérszőrök kialakulásához szükség van a RHD6 transzkripciós faktor kifejeződésére. Ez szabályozza a RSL4 transzkripciós faktort. Ez a faktor közvetlenül szabályozza számos peroxidáz termelését. A peroxidázok mellett az RBOH enzimek is részt vesznek a ROS felhalmozásában. A ROS a gyökérszőr csúcsában lokalizálódik, ami Ca^{2+} csatornákat aktivál, a citoplazma Ca^{2+} -szintje megnő. A szőrben egy Ca^{2+} gradiens alakul ki, aminek a legnagyobb koncentrációja a gyökérszőr csúcsában található. A Ca^{2+} növekedésével a RBOH ROS termelése is növekszik (*Mangano és mtsai. 2017*). A gyökércsúcs összejt mikrokörnyezetének (niché-nek) fenntartásában is szükség van ROS-ra. APP1 szabályozza a ROS szintet, túltermelésével megnő a ROS koncentrációja, ami a nyugalmi sejtek osztódását és a disztális összejtek differenciálódását serkenti. A PHB3 fehérje csökkenti a ROS szintet, ezen keresztül képes gátolni az ethylene response factor (ERF) transzkripciós faktorok expresszióját. ERF-ek fitoszulfokineket (PSK) szabályoznak, amik szulfonált pentapeptid hormonokat hoznak létre. Ezek a hormonok a sejtek dedifferenciálódását és proliferációját regulálják (*Kong és mtsai. 2018*). A reaktív oxigén formák szintje befolyásolja a sejtciklust is. H_2O_2 gátolja a sejtciklusban részt vevő géneket. A DNS sérülések hatására SOG1 szabályozza a FMO1 enzimet, ami megváltoztatja a H_2O_2 szintjét (*Mase és Tsukagoshi 2021*) (2. ábra).



2. Ábra: Az ábra a ROS jelátvivő molekulaként betöltött szerepét mutatja be a gyökerek fejlődésében. A bal oldali részen a gyökér 3 zónáját lehet látni, A piros szín a O_2^- , a zöld pedig a H_2O_2 gradiensét jelzi. Az ábra többi része a ROS szerepét ismerteti számos folyamatban. A nyilak pozitív, a tompa végű vonalak pedig negatív szabályozást jelentenek. PER: peroxidáz, RBOH: NADPH oxidáz, DSB: kettős szál törése, SCN: őssejt niche, LR: oldalgyökér, CS: Caspary-csík. (Mase és Tsukagoshi 2021).

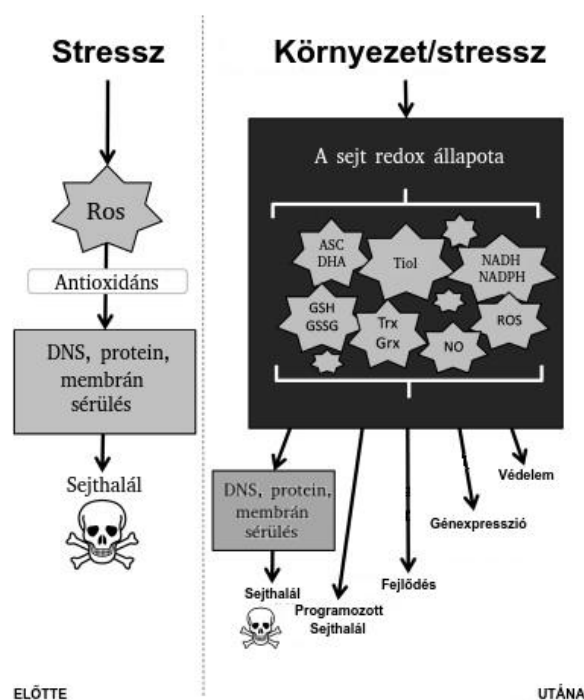
2.2. A sejtek redox állapota

2.2.1. A redox állapotot meghatározó endogén tényezők

A sejtek redox állapotát a sejten belül található redox aktív molekulák összessége határozza meg (3. ábra, Potters és mtsai. 2010). Régebben a ROS-t a sejt károsodásával asszociálták, azóta ez a nézet megváltozott.

A redox aktív molekulák redox állapotát az össz molekula mennyiség és azon belül a redukált és oxidált formák aránya határozza meg. Az aszkorbát (ASC/MDHA/DHA), glutation (GSH/GSSG) és piridin molekulák (NADPH/NADP⁺, NADH/NAD⁺) redox párjai egymással kölcsönhatásban vannak. Az aszkorbát (ASC) monodehidroaszkorbáttá (MDHA, majd dehidroaszkorbáttá (DHA) oxidálódik, ezt a dehidroaszkorbát-reduktáz redukálja vissza ASC-tá. A redukálása során glutation (GSH) oxidálódik (Noctor és Foyer 1998). A glutation egy tripeptid, ami tiol-csoporttal rendelkezik. Oxidálódása során dimerizálódik (GSSG). Az oxidált formát a glutation-reduktáz redukálja vissza NADPH segítségével. A GSH-t általános

redox pufferként lehet tekinteni, továbbá a sejtek kén raktározására is használják, és szerepe van a sejtek génexpressziójának szabályozásában, a nehézfémek és xenobiotikumok semlegesítésében. Normál körülmények között 90-99%-a redukált formában van jelen. A ROS semlegesítése aszkorbát-glutation cikluson keresztül csökkenti a redukált glutathion arányát 30-80%-ra (Noctor és mtsai. 1998). A NADPH és NADH a többi antioxidáns regenerálásánál játszik fontos szerepet. Ezért a sejt redox pufferének alapjának tekinthetők (Hashida és mtsai. 2009). Ezek mellett számos egyéb antioxidáns is részt vesz a sejtek redox állapotának fenntartásában. Ilyen molekulák a redox aktív fenol vegyületek, flavonoidok, karotinoidok, citokrómok, tokferolok és tokotrienolok, poliaminok, kén csoporttal rendelkező fehérjék és kis molekulásúlyú másodlagos anyagcseretermékek. A redox aktív molekulák szintje függ a sejten belüli elhelyezkedéstől, a sejt fejlődési állapotától, a kompartmentumokban uralkodó pH-szinttől és a stresszorok hatásától (3. ábra) (Potters és mtsai. 2010).



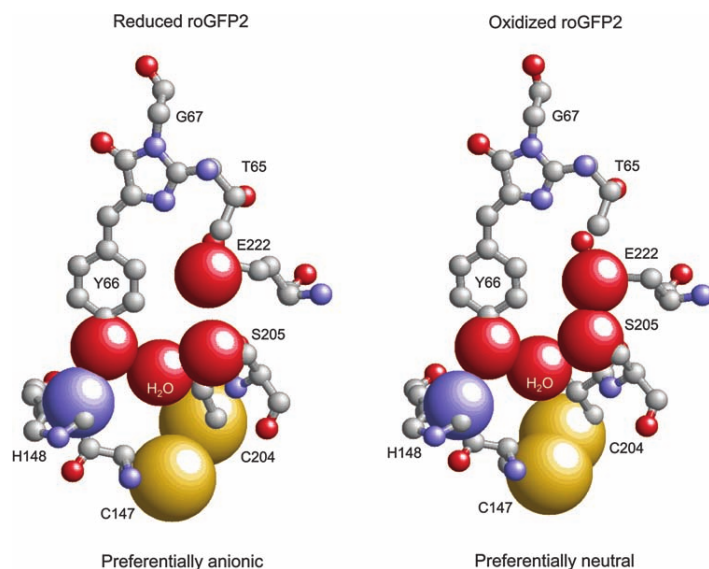
ELŐTTE UTÁNA
3. Ábra: A stressz szemlélet megváltozása, a sejt redox állapota több folyamatot is befolyásol. ROS: reaktív oxigén fajták, NO: nitrogén-monoxid, ASC: aszkorbát, DHA: dehidroaszkorbát, GSH: glutathion, GSSG: a glutathion oxidált dimere, Trx: tioredoxin, Grx: glutaredoxin (Potters és mtsai. 2010)

2.2.2. A redox állapot változása stressz hatására

A ROS különböző környezeti stresszorok, mint például ozmotikus stressz, fagy vagy magas hőmérséklet hatására túltermelődik (Potters és mtsai. 2010). H_2O_2 keletkezik a fotorespiráció során is. A H_2O_2 -ből Fe^{2+} -ion jelenlétében a Fenton-reakció során a még reakcióképesebb hidroxil-gyökök keletkeznek, amik képesek reakcióba lépni a sejt biológiai molekuláival, ami a sejt halálához is vezethet. Tehát létfontosságú, hogy a növény képes legyen csökkenteni a ROS szinten. Ezt a sejtek enzimatis és nem-enzimatis ROS semlegesítő rendszereivel éri el (Kapoor és mtsai. 2015, Nadarajah 2020). A kisebb mértékű stressz esetén a növények alkalmazkodni, akklimatizálódni tudnak a megváltozott körülményekhez. Ezt a fehérjék poszttranszlációs módosításával és hormonok funkciójának és szintjének módosításával éri el, amely mechanizmusok indukálásában a ROS, pontosabban a H_2O_2 és a O_2^- jelátvivő szerepe mellett fontos a GSH, és általában a tiolok redox állapotában bekövetkező változás is. Bár a növényekben számos redox aktív molekula található, az ezirányú vizsgálatok azt mutatták, hogy a sejtek redox állapotát a glutation redukciós potenciállal lehet legjobban jellemezni (Cano-Europa és mtsai. 2015).

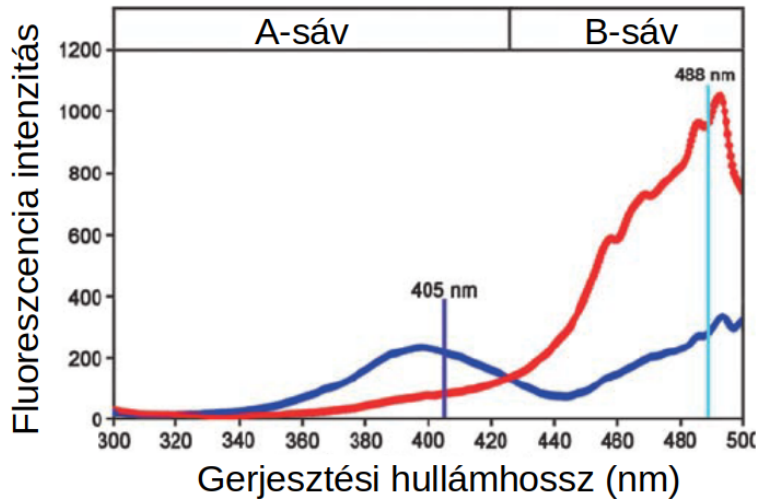
2.2.3. Az *in vivo* redox állapot meghatározása roGFP2 konstrukció használatával

A glutation mennyisége és redox állapota – a sejtekben uralkodó különböző pH értékek miatt is – kompartmentumokként változik (Noctor és mtsai. 1998). A hagyományos, glutation extrakción és *in vitro* reakciókon alapuló mennyiségi meghatározás csak közelítő információt adott. A genetikailag kódolt fluoreszcens fehérjék kifejlesztése azonban *in vivo* redox potenciál meghatározást lehetővé tevő módszer. Ilyen fehérje a módosított zöld fluoreszcens fehérje (GFP), amit eredetileg *Aequorea victoria* medúzából izoláltak. Ez a fehérje egy ún. β -hordóból és a benne lévő kromofór csoportból áll. Azon tulajdonsága, hogy proteázok nem képesek bontani és stabil marad a sejt különböző pH-viszonyai között, kiváló alappá tette a bioszenzorok fejlesztéséhez. Fel lehet használni a ditiol és diszulfid egyensúly vizsgálatára úgy, hogy a fluoreszcens fehérjébe mesterségesen helyeztek oxidált állapotban diszulfidokat képező aminosavakat (ciszteineket), amelyek redukált/oxidált állapottól függően eltérően módosítják a kromofór tulajdonságát. Így redox szenzitív GFP-eket (roGFP1-4) hoztak létre. A roGFP2 készítéséhez a megnövelt fluoreszcenciájú, ún. enhanced GFP-ben (EGFP) a 147-es és 204-es helyen ciszteinre cserélték az aminosavat (4. ábra), továbbá a kódoló szekvenciához a humán glutaredoxin1 (GRX1) gént is hozzáépítették, hogy minél gyorsabban kialakuljon egy egyensúly a roGFP és a glutation redox állapota között.



4. Ábra: A roGFP2-be illesztett ciszteinek a redox állapottól függően változtatják meg a molekula alakját. A bal oldalon a redukált, anion állapota, a jobb oldalon pedig az oxidált semleges állapota látható (Meyer és Dick 2010)

A roGFP2-nek két állapota lehet, amire a gerjesztési spektrumokon A-band-ként és B-band-ként jelzett maximum értékek jellemzőek. Az A-band a fehérje protonált, semleges formájára, a B-band pedig a disszociált, anion formájára jellemző maximális gerjesztési fluoreszcens intenzitás értékeket tartalmazza. A fehérje protonált állapota 405 nm hullámhosszú fénnel gerjeszthető, míg redukált, anionos formában 488 nm-essel lehet legjobban gerjeszteni (5. ábra) (Meyer és Dick 2010).

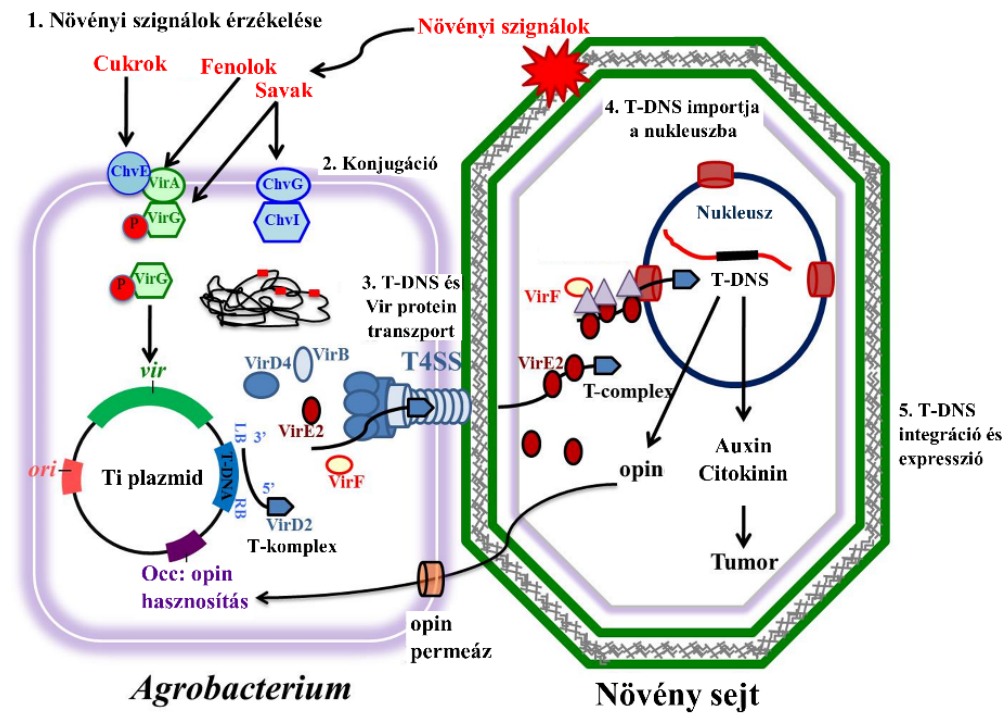


5. Ábra: A roGFP2 két gerjesztési csúccsal rendelkezik. Protonált formája 405 nm hullámhosszú fény hatására bocsátja ki a legintenzívebb fényt. A redukált formája 488 nm-en (Meyer és Dick 2010).

2.3. A roGFP2 konstrukció bejuttatása növényekbe

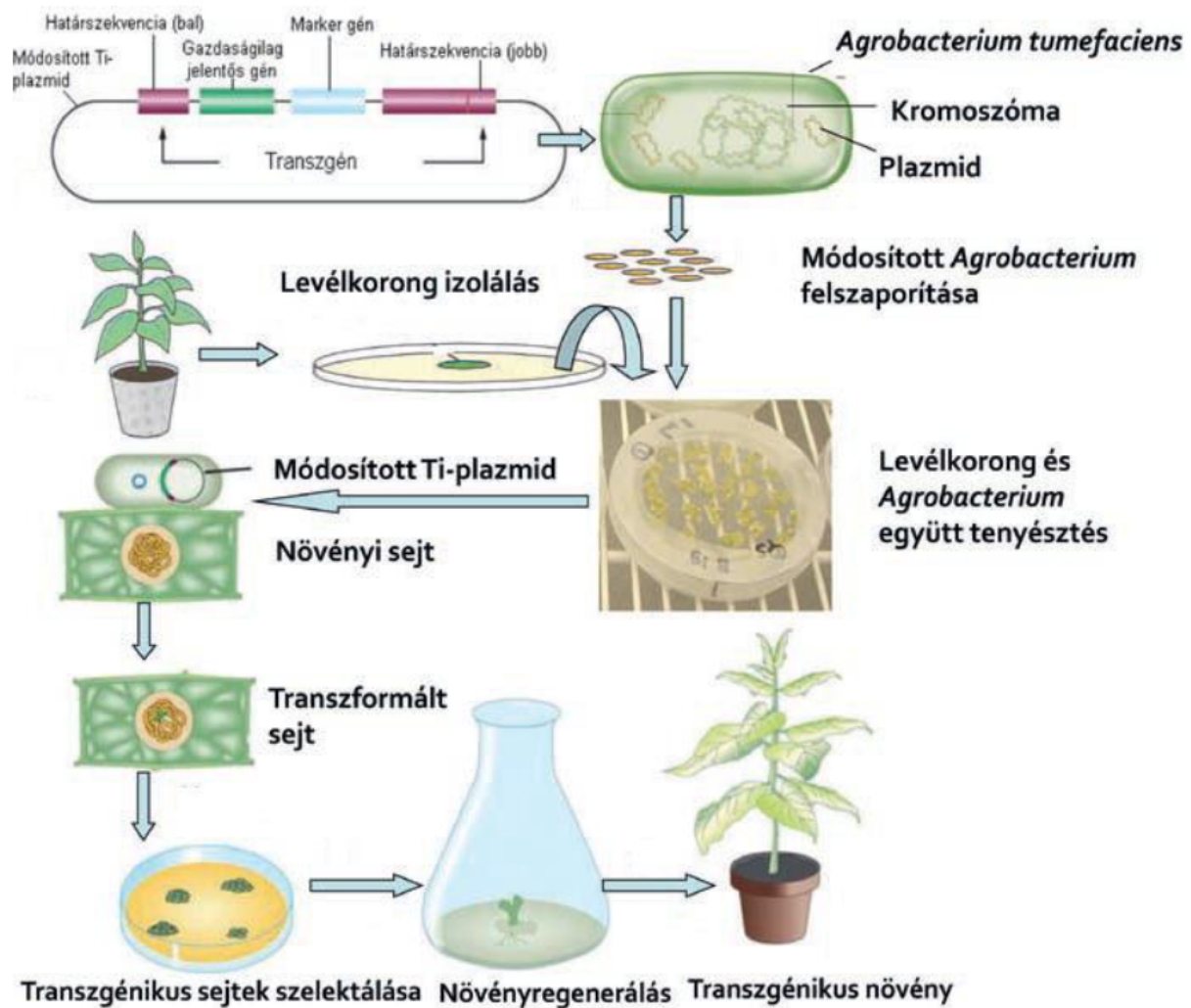
2.3.1. Az *Agrobacterium tumefaciens* segítségével

Az *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) egy Gram-negatív talajbaktérium (Young és mtsai. 2001). Pélcika alakú, peritrich csillókkal rendelkezik, helyváltoztatásra képes. Az *Alphaproteobacteria* osztály *Rhizobiaceae* családjába tartozó patogén, széles gazdakörrel rendelkezik, növényekben tumort (pl. gyökérnyak golyva) okoz. Sérüléseken, sebeken keresztül képes fertőzni. A növények sérülésekor fenolos vegyületek, pl. acetosziringon szabadul fel, amit a baktérium felismer, és pozitív kemotaxissal a sérülés felé mozog. Az acetosziringon a virulencia géneket aktiválja. Ezek a gének a Ti-plazmidon (tumor-indukáló) találhatóak. A virulencia gének az ún transzfer DNS (T-DNS) kivágásáért és a növényi sejtbe jutásáért felelős fehérjéket kódolják. A T-DNS auxin, citokinin és opinok szintéziséért felelős géneket tartalmaz (Gordon és mtsai. 2015). Az opinokat a baktérium szén- és nitrogén forrásként képes felhasználni (6. ábra).



6. Ábra: Az *Agrobacterium* fertőzés főbb lépései (Hwang és mtsai, 2017).

A T-DNS-t határszekvenciák veszik körbe, így ha a T-DNS-ben módosítást végeznek, a megváltoztatott szekvencia képes beépülni a növényi genomba. A transzformáció viszonylag egyszerű protokollal rendelkezik, ami során a megsebzett növényi rész és a baktérium érintkezését kell megvalósítani, ezt baktérium szuszpenzió használatával érhető el. Ezután egy inkubációs szakasz végeztével a növényi sejtekbe bejut és beépül a T-DNS. Végül a növényi sejteket szelektálni és regenerálni kell (7. ábra). Azonban a módszer sikerét befolyásolják a növények, fajtájuk, a baktérium törzs, a szelektációs és inkubációs lépés (Heszky 2017).



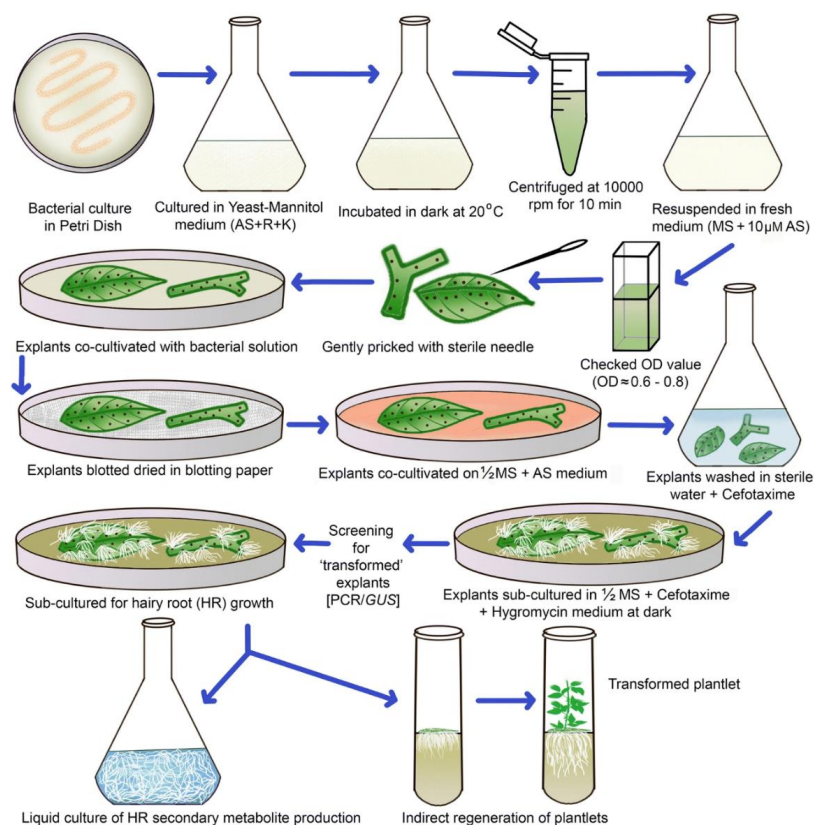
7. Ábra: *Agrobacterium tumefaciens* általi transzformálás általános menete (Heszky 2017)

2.3.2. A *Rhizobium rhizogenes* használata genetikai transzformációra

A *Rhizobium rhizogenes* a *Rhizobiaceae* családba tartozó Gram-negatív talajbaktérium. Magasabb rendű növényekben hajszálgökeresedést okoz, ami mechanikai sérülések helyén alakul ki (Cardarelli és mtsai. 1987). Géntszfere az *A. tumefaciens*-hez hasonlóan zajlik le. Az *R. rhizogenes* gökeresedést indukáló Ri-plazmid T-DNS-e rol lokuszokat tartalmaz. Négy rol található a plazmidban, feladatuk a hajszálgökerek növesztésében van. Például a rol A a gökerek morfológiájáért felelős, a rol C az apikális dominancia csökkentéséért felelős (Rawat és mtsai. 2019). Mivel a *R. rhizogenes* is képes T-DNS-t integrálni a növény genomjába, a génebeszet egyik fontos eszközévé vált.

A *R. rhizogenes* általi transzformálás egyik legnagyobb előnye, hogy a T-DNS által kódolt géneket csak a fertőzés helyén újonnan növí gökerek fejezik ki. Tehát ez a módszer tranziens génepressziót okoz. A transzformálás során a növényeken, növényi részekén sebet

kell ejteni, és baktérium szuszpenzióba kell rakni, hogy a baktérium érintkezzen a sebbel. A növényi részeket a baktériumokkal együtt inkubálják, antibiotikum oldattal mossák, majd szelekciós táptalajra helyezik. Ezt követően lehet gyökérkultúrát előállítani, illetve hajtást regenerálni (8. ábra). Ezek a gyökerek képesek különböző anyagcsere termékeket termelni. Mivel stabil génexpresszióval rendelkeznek, a belőlük készült gyökér kultúrák ipari hasznosítása több esetben megvalósult (Gantait és Mukherjee 2020).



8. Ábra: Gyökérkultúra készítése: A baktérium pázsitból baktérium szuszpenziót készítenek, amit sötétben 20 °C-on inkubálnak. Centrifugálják és reszuszpendálják a sejteket. A növényi részeket sebzik és a baktérium szuszpenzióba mártják. Ezután a növényekről leitatják a folyadékot, és a baktériumokkal koinkubálják. Antibiotikum oldattal mossák a növényi részeket, szelekciós táptalajra kerülnek, így csak a transzformáns gyökerek maradnak meg. Ezekből lehet gyökér kultúrát csinálni vagy hajtást regenerálni (Gantait és Mukherjee 2020).

3. Célkitűzés

Az SZTE Növénybiológiai Tanszéken évtizedek óta folynak vizsgálatok a gyökerek stressztűrésben játszott szerepével kapcsolatosan. Mivel az utóbbi években előtérbe került a redox állapot jelentősége, annak követésére alkalmazásra került a roGFP2 redox próba. A vizsgálatokhoz az *A. tumefaciens* által létrehozott, ún. stabil transzformáns mutánsokat használják. Azonban a roGFP2 konstrukció kifejeztetéséhez, a gyökerek redox potenciáljának vizsgálatához megfelelő lehet a *R. rhizogenes* használata is, ami sokkal gyorsabb és könnyebben kivitelezhető alternatívát ajánlhat fel. Munkánk során célul tűztük ki a *R. rhizogenes* közvetítte transzformálás alkalmazását a roGFP2 *Arabidopsisba* juttatására. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy kiváltható-e a stabil mutánsok létrehozása a tranziens génexpresszióval rendelkező növényekkel. E célból a genetikailag kódolt redox próbát tartalmazó plazmidot hordozó *R. rhizogenes* indukált járulékos gyökereket só-és ozmotikus stressznek tettük ki. Vizsgálataink során kíváncsiak voltunk az alábbiakra:

- Megfigyelhetők-e változások különböző stressz kezelések hatására? Követhetők-e a változások idő függvényében ?
- Alkalmas-e a *R. rhizogenes*-közvetítette transzformáció a roGFP2 kifejeztetésére a növények járulékos gyökereiben?
- Hogyan viszonyulnak az így kapott redox potenciál értékek a redox próbát *A. tumefaciens*-sel bejuttatott, stabil transzformáns vonalak használatával kapott értékekhez?

4. Anyagok és módszerek

4.1. A kísérleti növény

A kísérlet során az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) Columbia (Col-0) ökotípusát használtuk. A lúdfű a növénybiológiai kutatások modell organizmusa. A *Brassicaceae* családba tartozó kétszikű növény. Viszonylag egyszerű nevelni, kis genommal rendelkezik, rövid életciklusa van, önbeporzó, sok magot hoz, és jól transzformálható (Horváth és mtsai. 2019). Kísérleteink során steril kultúrában tartott négy napos csíranövényeket transzformáltunk.

4.2. Az *Arabidopsis thaliana* magok steril körülmények közötti csíráztatása

A kísérlethez használt magokat 1 percig mostuk 70 %-os etanolban. Miután leöntöttük, 4%-os hipóval (nátrium-hipoklorit) sterilizáltuk a magokat. 10-15 perc után ötször mostuk steril vízzel. Ezt követően a magokat 24 óráig 4 °C-on tartottuk steril vízben.

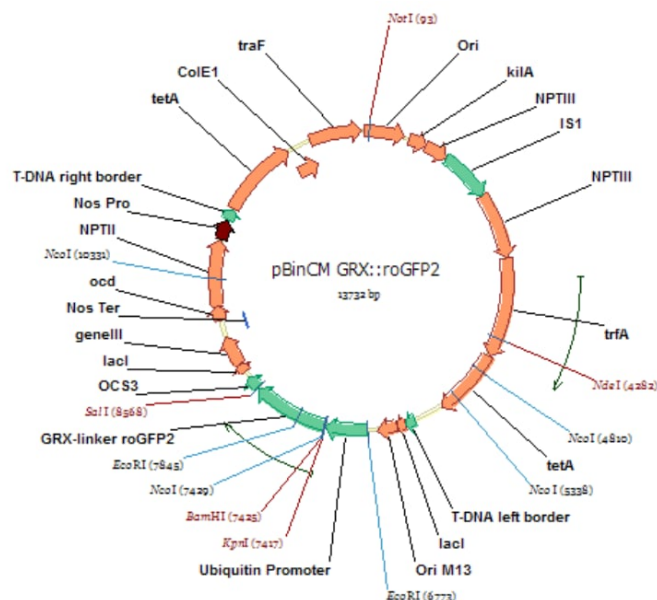
A steril magokat ½ MS táptalajra ültettük. A csíranövényeket 4 napig neveltük klímakamrában (Fitoclíma S 600 PLH, Aralab, Rio de Mouro, Portugal) 16 óra fény / 8 óra sötét megvilágítás mellett 22 °C-on (9. ábra).



9. Ábra: A növénynevelő kamra különböző életkorú növényekkel (fotózta: Tompa Bernát)

4.3. A transzformációhoz használt plazmid konstrukció és baktérium törzsek

A transzformáláshoz használt *R. rhizogenes* ARqua-1 plazmidot Rigó Gábor (HUN-REN SZBK) bocsátotta rendelkezésünkre. A plazmid tartalmazta a Grx1-roGFP2 konstrukciót, ami a citoszolban fejeződik ki (10. ábra, Meyer és Dick 2010). A transzformált ARqua-1 törzs rezisztens kanamicinre és klóramfenikolra.



9. Ábra: A GRX1-roGFP2-t kifejező Ri-plazmid konstrukciója (Meyer és Dick 2010)

4.4. Tápoldatok/táptalajok

4.4.1. Növényi táptalajok

Az *Arabidopsis* növények neveléséhez $\frac{1}{2}$ MS (Murashige és Skoog 1962) táptalajt használtunk. Az MS só tartalmazza a növény növekedéséhez szükséges tápelemeket. Szacharózt használtunk szénforrásként 5 g/l koncentrációban. A táptalaj 5,8-as pH értékre lett beállítva (1. táblázat). A baktériummal történő koinkubálás esetén 125 μ M acetosziringonnal (ACS) egészítettük ki.

$\frac{1}{2}$ MS táptalaj	
MS só	2,2 g/l
Szacharóz	5 g/l
Agar	8 g/l
pH	5,8

1. táblázat: A növények nevelésére használt táptalaj. MS: Murashige-Skoog. A tápsó a Duchefa (Haarlem, Hollandia) gyártótól származik

A koinkubálás után szelekciós táptalajra ültettük ki a növényeket. A táptalaj cefotaximot és karbenicilint tartalmaz. Erre azért van szükség, hogy a *R. rhizogenes* baktériumokat eltávolítsuk a rendszerből.

$\frac{1}{2}$ MS táptalaj	
MS só	2,2 g/l
Szacharóz	5 g/l
Agar	8 g/l
pH	5,8
Cefotaxim	200 mg/l
Karbenicilin	200 mg/l

2. táblázat: A transzformált növények nevelésére használt táptalaj. MS: Murashige-Skoog. A tápsó a Duchefa (Haarlem, Hollandia) gyártótól származik

4.4.2. Baktérium tenyésztésénél használt táptalaj

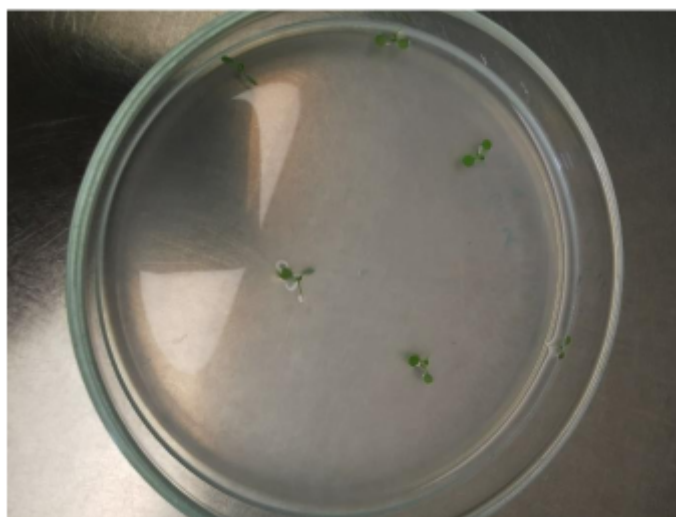
A *R. rhizogenes* növesztéséhez LB (Luria-Bertani) táptalajt használtunk (Bertani 1951). Az ARqua-1 törzset 100 mg/l kanamicint és 34 mg/l klóramfenikolt tartalmazó LB táptalajon növesztettük. A transzformációt megelőző napon LB tápoldatba oltottuk a baktériumot, és 200 rpm-en rázatva (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan) 28 °C-on overnight nőttek. A tápoldat nem tartalmazott klóramfenikolt és agart.

LB táptalaj	
LB só	15,5 g/l
PH	7,0
Agar	15 g/l
Kanamycin	100 mg/l
Klóramfenikol	34 mg/l

3. táblázat: A baktériumok nevelésére használt táptalaj. LB: Luria-Bertani. A tápsó a Duchefa (Haarlem, Hollandia) gyártótól származik.

4.5. A növények transzformálása

A baktériumokat LB tápoldatban 28 °C-on tenyésztettük, amíg az oldat el nem érte az OD₆₀₀ = 0,8-as értéket. Miután elérte ezt az értéket az oldatot lecentrifugáltuk 4500 rpm-en 15 percig szobahőmérsékleten Eppendorf 5804 R centrifugával. A felülúszót leöntöttük, a baktériumokat pedig felszuszpendáltuk. A 4 napos növények gyökerét levágtuk és a hajtásokat 5 percre a baktérium szuszpenzióba helyeztük (11. ábra).



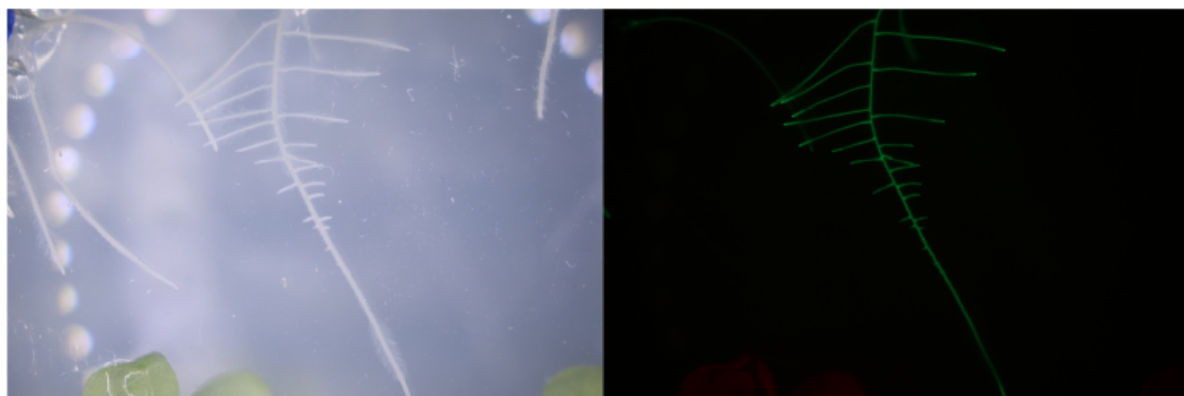
11. Ábra: A levágott gyökerű növények *R. rhizogenes* szuszpenzióban

Ezt követően a növényeket szűrőpapírra helyeztük, hogy a felesleges oldatot leitassuk, majd acetoszirington tartalmú ½ MS táptalajra helyeztük és 2 napig sötétben inkubáltuk őket. Az inkubációs idő lejártával a növényeket 5 percig 200 mg/l koncentrációjú cefotaxim és

karbenicillin mosóoldatban átmostuk. Ez eltávolítja a baktériumokat a rendszerből. A növényeket 200 mg/l cefotaximot és karbenicillint tartalmazó szelekciós táptalajra ültettük, majd a fejlődő gyökereket sztereomikroszkóp segítségével ellenőriztük.

4.6. A transzformáns gyökerek ellenőrzése

A transzformálás során a roGFP2 fluoreszcens fehérjét kódoló gént ültettük be a növényi sejtekbe, amely marker génként is használható a transzformáns gyökerek azonosításához. Fluoreszcens sztereomikroszkóp segítségével képesek voltunk kiválasztani a transzformáns gyökereket. Általában egy héttel a transzformálást követően különítettük, illetve jelöltük meg a Petri csésze alján a transzformáns gyökereket. Az Olympus SZX12 fluoreszcens sztereozoom mikroszkópját használtuk (HUN-REN SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium). A transzformált gyökerek zöld színű fényt bocsátanak ki (12. ábra).



12. Ábra: A roGFP2 konstrukciót kifejező gyökerek fluoreszcens sztereomikroszkóp alatt zöld színt emittálnak (Fotózta: Tompa Bernát)

4.7. Redox állapot megállapítása ozmotikus stressz hatása mellett

4.7.1. Konfokális fluoreszcens mikroszkópos analízis

A transzformálás során bejuttatott roGFP2 fluoreszcens fehérje a GRX enzim segítségével érzékeli a glutation redox állapotát: A GRX a GSSG-vel reakcióba lépve oxidálódik. Az oxidált GRX enzim képes közvetíteni az oxidációt a roGFP2 felé.

A gyökerek csúcsi régióját Olympus FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk (SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium). A mérés során a roGFP2-t 405 nm és 488 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettük. A mikroszkóp által elkészített képeket ImageJ alkalmazással elemeztük és az intenzitás arányát kaptuk meg (13. ábra).



13. Ábra: A redox potenciál meghatározása roGFP2 használatával (Schwarzländer és mtsai. 2008)

4.7.2. Ozmotikus- és sóstressz redox potenciálra kifejtett hatásának vizsgálata

A csíranövényeket különböző kezeléseknek vetettük alá. Előzetes eredmények alapján ozmotikumként, mannitolt 200 mM és 300 mM koncentrációban, szorbitolt szintén 200 mM és 300 mM koncentrációban, valamint 100 mM és 150 mM NaCl-t (izoozmotikus sókoncentrációk) választottunk. Munkánk során 3 kísérleti rendszert alkalmaztunk:

- 1) Az ozmotikus stressz hatását 1 óra elteltével *R. rhizogenes* által transzformált 2 hetes gyökereken határoztuk meg. A gyökereket a megfelelő ozmotikus koncentrációt tartalmazó oldatokba helyeztük 60 percre.
- 2) A csírázás utáni korai hatás modellezéséhez egy hetes *R. rhizogenes* által transzformált gyökereket helyeztünk a fenti ozmotikum koncentrációkkal kiegészített táptalajokra, és 5 nap elteltével határoztuk meg a redox potenciálokat.
- 3) Az ozmotikus- és sóstressz hatásának a csíranövények korai fejlődésénél a redox potenciálra gyakorolt hatás vizsgálata *A. tumefaciens* segítségével bejuttatott roGFP2-t kifejező transzformánsokkal. Ebben az esetben az Arabidopsis magvak a fenti ozmotikum koncentrációkat tartalmazó táptalajon csíráztak, és 5 nap elteltével detektáltuk a roGFP2 fluoresszenciáját konfokális pásztázó mikroszkóp (Olympus FV1000) segítségével, és határoztuk meg a gyökerek redox potenciálját.

4.7.3. A redox potenciál számolása

Az Olympus FV1000-en keresztül megkapott képeket ImageJ alkalmazáson keresztül elemeztük. Fluoreszcencia intenzitást mértünk vele, amiből kiszámoltuk a gyökér csúcsmerisztémájának redox potenciálját. Ehhez a roGFP2 oxidáltságát kellett megállapítani, amit a redox próba redukált és oxidált állapotának ismeretében tudunk megadni:

$$OxD_{roGFP2} = - \left(\frac{R - R_{red}}{\left(\frac{I_{488\ red}}{I_{488\ ox}} \right) * (R_{ox} - R) + (R - R_{red})} \right)$$

ahol az R a mintán mért két hullámhosszon gerjesztett intenzitás értékek aránya (I_{405}/I_{488}), R_{red} a maximálisan redukált mintán mért intenzitások aránya. Ennek az állapotnak a létrehozásához 10 mM ditionitrellal (DTT) kezeltük a gyökereket. R_{ox} pedig a maximálisan oxidált mintán mért arány. Ehhez 5 mM 4-4'-dipiridil-diszulfidot (DPS) adtunk a gyökerekhez. Ebből az eredményből az alábbi képlet segítségével lehet kiszámolni a glutation-függő redox potenciált:

$$E_{GSH} = E_{roGFP2}^0 - \left(\frac{2,303 * R * T}{z * F} \right) * \log_{10} * \left(\frac{1 - OxD_{roGFP2}}{OxD_{roGFP2}} \right)$$

ahol E_{roGFP2}^0 a roGFP2 molekula középponti redox potenciálja, ez 272 mV. R az egyetemes gázállandó, ami $8,315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. A T az abszolút hőmérséklet 298,15 K értéken, z az átadott elektronok száma (2) és F a Faraday-állandó (96485 C mol^{-1}) (*Schwarzländer és mtsai., 2008*).

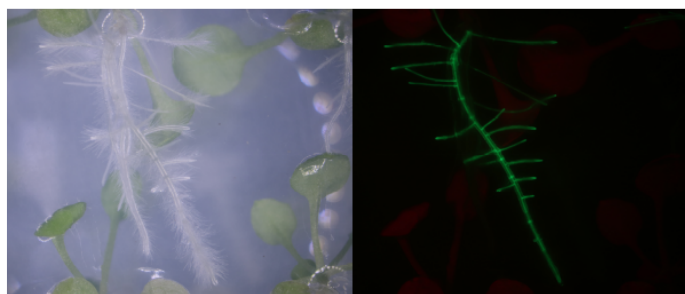
4.8. Statisztikai analízis

A kísérleteket minimum két biológiai ismételtsben végeztük el, a kéthetes gyökerek esetében (1. kísérleti rendszer) legalább 10 párhuzamos méréssel. A kisebb gyökerek ozmotikumokat tartalmazó táptalajra helyezése (2. kísérleti rendszer), illetve a táptalajon történő csírázás (3. kísérleti rendszer) esetén min. 3 mérés történt. A dolgozatban bemutatott ábrákon egy biológiai ismételts átlag értékeit és a hozzá tartozó szórást ($\pm$ SD) ábrázoltuk. Az adatok statisztikai elemzését Student-féle t-próba segítségével végeztük el, és a szignifikáns különbségeket az alábbiak szerint jelöltük: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 Az ozmotikus stressz hatás vizsgálata a roGFP2-t *R. rhizogenes*-közvetítette transzformációval kifejeztetett gyökereken

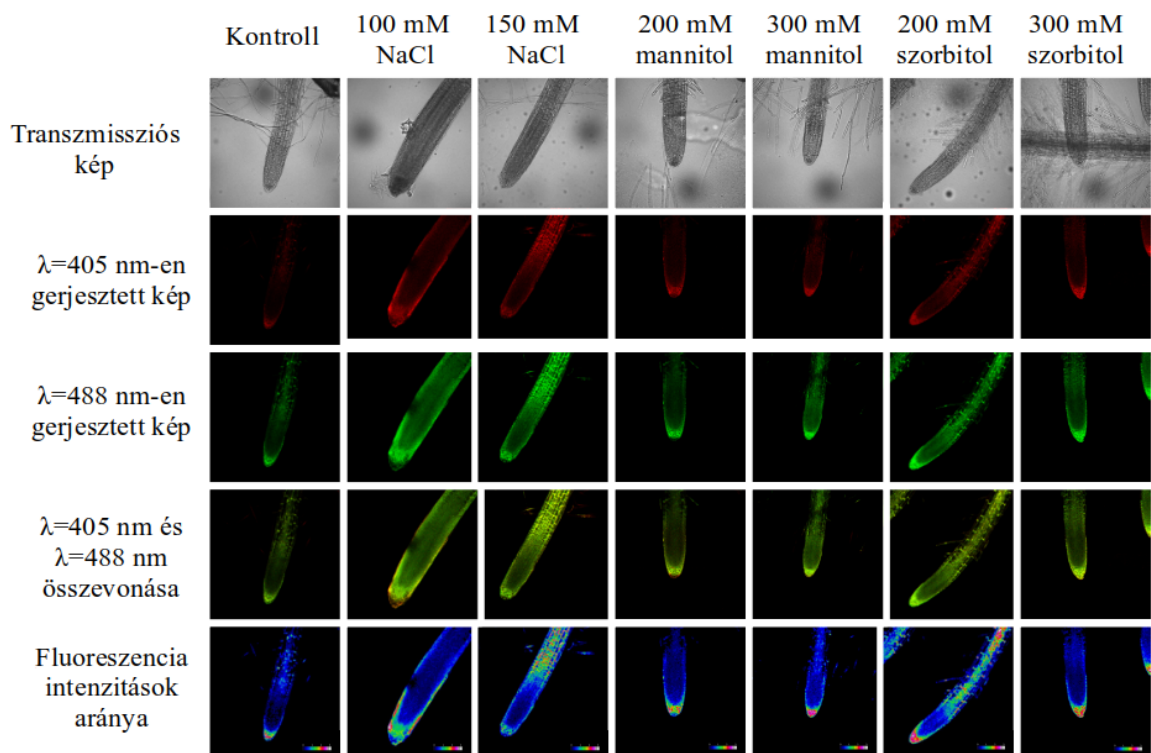
Kísérleteink során sikerrel alkalmaztuk a *R. rhizogenes*-közvetítette transzformációs módszert a roGFP2 konstrukció járulékos gyökerekben történő kifejeztetésére. A kísérleti körülmények optimalizálásával átlagosan a növények 71,62 %-ának volt transzformáns gyökere. A gyökereket fel lehetett használni redox potenciál változások vizsgálatára (14. ábra).



14. Ábra: A fluoreszcens gyökerek képesek voltak megfelelő erősségű fényt emittálni. A jobb képen látható a roGFP2 konstrukciót kifejező gyökér, ami jól elkülöníthető a nem transzformáns gyökerektől (Fotózta: Tompa Bernát)

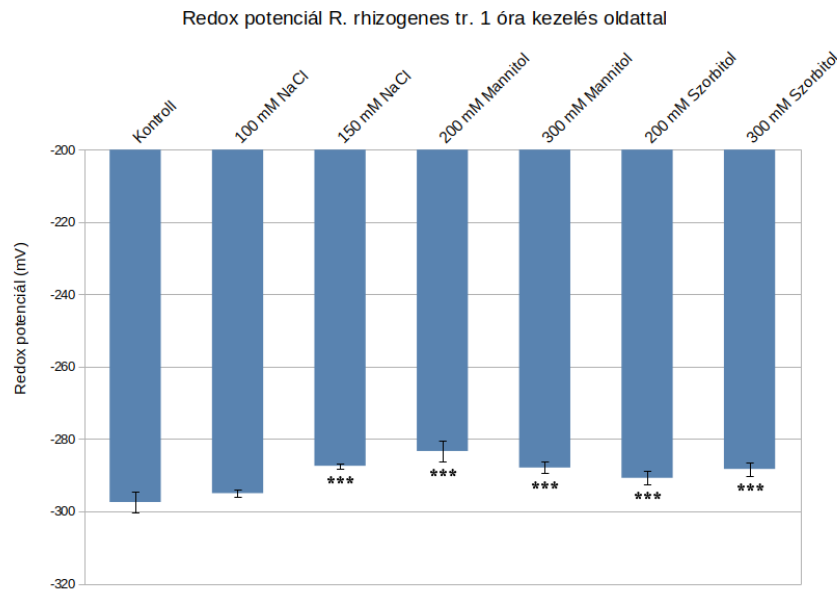
5.2. A kezelések hatását jól nyomon lehetett követni a roGFP2 fluoreszcencia detektálásával.

A 15. ábrán egy-egy kiválasztott gyökér esetében mutatjuk be a konfokális fluoreszcens mikroszkópos képet, illetve a mesterséges színezéssel szemléltetett intenzitás arányok alakulását. Itt jól látszik, hogy a különböző ozmotikumok hatására megnövekedett a roGFP2 oxidált formájának aránya. Általánosságban megállapítható, hogy bár különböző mértékben, de detektált fluoreszcencia-intenzitás 1 óra elteltével fokozódott mind a 405 nm mind a 488 nm-en történő excitáció után. Sőt, az arányuk változása arra utal, hogy a gyökerek redox állapota az alkalmazott kezelések hatására oxidáltabb lett.



15. Ábra: Reprezentatív képek a *Rhizobium rhizogenes* által transzformált kéthetes gyökerek 1 órás ozmotikus stressz kezelését követően. A kezelések hatására a roGFP2 molekulák nagyobb része oxidált állapotba került a kontroll növényhez képest. A felvételek sorrendjesoronként: 1. sor: fénymikroszkópos képek, 2. sor: $\lambda_{exc}=405$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe, 3. sor: $\lambda_{exc}=488$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe, 4. sor: a 2. és 3. sorban lévő képek összevonása, 5. sor: A fluoreszcencia intenzitások arányának ábrázolása (I_{405}/I_{488}) a megadott színskála alapján

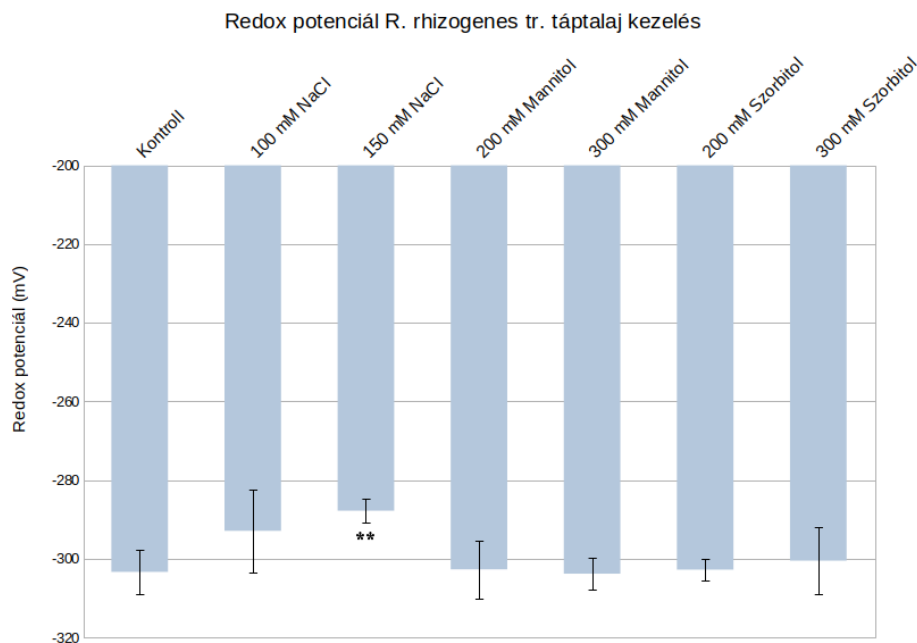
A redox potenciál értékeket a gyökerek proximális merisztémáját tartalmazó régiójában határoztuk meg. Az eredmények statisztikai elemzése alapján szignifikáns különbség volt a kontroll és a különböző kezelések után mért redox potenciálokban (16. ábra). Érdekes módon, a legnagyobb változást a 200 mM mannitol esetében tapasztaltuk.



16. Ábra: A *R. rhizogenes* által transzformált gyökök merisztémájában mért redox potenciál értékek a kéthetes gyökök ozmotikumot tartalmazó oldatba helyezése után 1 órával. A kontroll gyökök negatívabb redox potenciálja redukáltabb redox állapotot jelez. Az adott kezelés kontrolltól való szignifikáns eltérését Student-féle *t*-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.3. Ozmotikus stressz kezelés hatásának vizsgálata a roGFP2-t *R. rhizogenes*-közvetítette transzformációval kifejeztetett egyhetes gyökök ozmotikumot tartalmazó táptalajra helyezése után 5 nappal

Az 5 napos kezelés hatására a transzformáns gyökökben minimális különbséget tapasztaltunk az ozmotikumot tartalmazó táptalajra átültetett növények és a kontroll növények redox potenciálja között. Szignifikáns különbség csak a 150 mM NaCl tartalmú táptalajon tartott gyökereknél volt megfigyelhető (17. ábra).

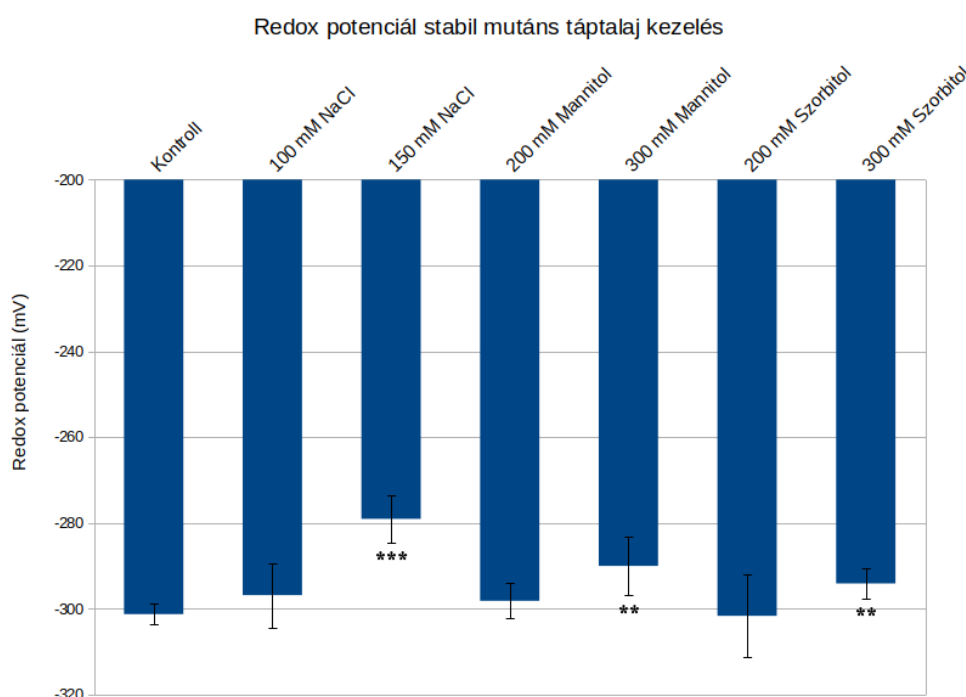


17. Ábra: *R. rhizogenes* által transzformált gyökerek merisztémájában mért redox potenciál értékek az egyhetes gyökerek ozmotikumot tartalmazó táptalajra helyezése után. A kezelés 5 napig tartott. Az ábrán egyedül a látható szignifikáns eltérés a kontroll növények potenciáljához képest. 150 mM NaCl tartalmú táptalajon nőtt gyökerek kevésbé negatív redox potenciálja oxidáltabb redox állapotot jelez. Az adott kezelés kontrolltól való szignifikáns eltérését Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (** $p \leq 0,01$).

Jiang és munkatársai a roGFP1 alkalmazásával elvégezték az 5 napos *Arabidopsis* gyökerek hosszmetzeti képének teljes egészén a redox potenciál meghatározását kontroll körülmények között és 100 mM NaCl alkalmazása után. Eredményeik szerint a gyökerek redox állapota a sókezelést követően az alkalmazott koncentrációtól és a kezelés időtartamától függően egy átmeneti oxidáltabb állapot után kontrollhoz közeli értéket igyekszik kialakítani, sőt bizonyos esetekben attól negatívabb értékek is megfigyelhetők. Hosszabb időtartamú vizsgálataikban a viszonylag alacsony NaCl koncentrációk (<100 mM) esetében a növények 3-6 nap alatt helyre tudták állítani a kontroll állapotú illetve a só kezelés előtti redox profilt (Jiang és mtsai, 2016). Feltételezésünk szerint a jelen kísérletben is az 5 nap alatt a gyökerekben indukálódtak azok a mechanizmusok, amelyek a redox homeosztázis helyreállítását biztosították a legtöbb esetben. Ez csak a 150 mM NaCl esetében nem történt meg.

5.4. Ozmotikus stressz kezelés hatásának vizsgálata az *A. tumefaciens* segítségével bejuttatott roGFP2-t kifejező transzformánsokkal a magvak táptalajra helyezése után 5 nappal

Az *Agrobacterium tumefaciens* által létrehozott stabil mutánsokról készült képek elemzése során a kontroll és ozmotikumot tartalmazó táptalajon nőtt növények redox potenciáljai között a nagyobb koncentrációjú ozmotikumok hatására alakult ki szignifikáns különbség (18. ábra).

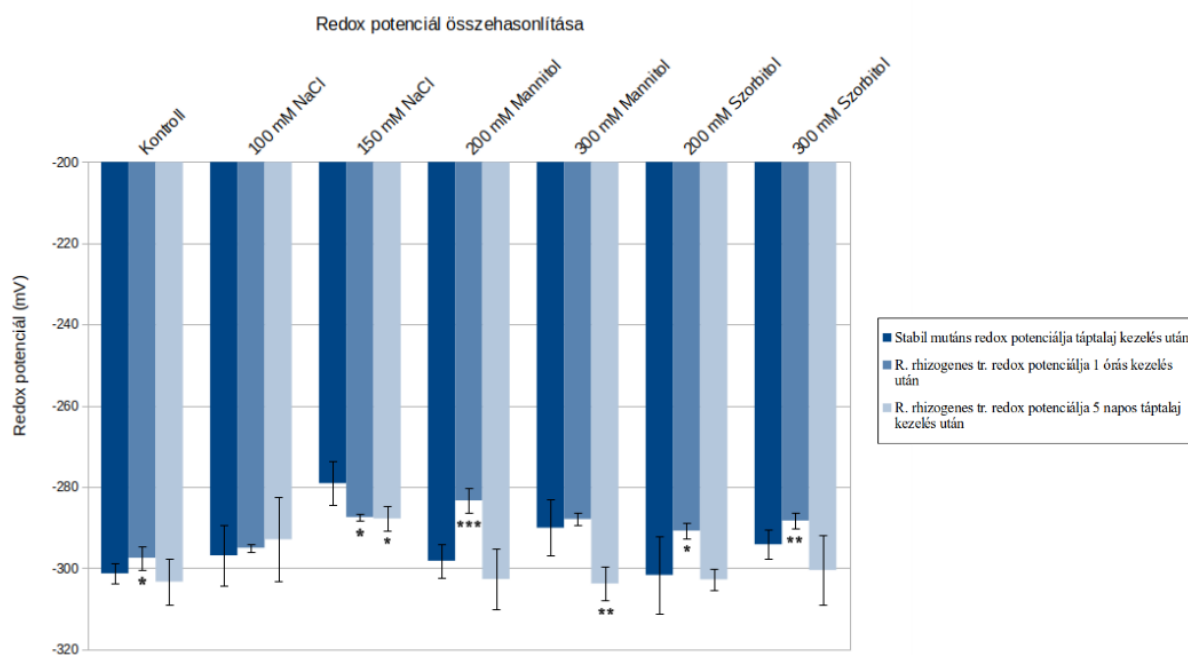


18. Ábra: *A. tumefaciens* által létrehozott stabil mutánsok gyökér merisztémájában mért redox potenciál értékek különböző ozmotikumot tartalmazó táptalajon történő csírázás után 5 nappal. A kezelések kontrolltól való szignifikáns eltérését Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.5. A *R. rhizogenes* és az *A. tumefaciens* által bejuttatott roGFP2 használatával kapott eredmények összehasonlítása

Az előzőekben bemutatott eredményeket a 19. ábrán összesítettük. Eredményeink azt mutatják, hogy a kezeletlen kontroll értékek mérése során és a mannitol vagy szorbitol alkalmazása esetében is a legkevésbé negatív értékeket abban az esetben kaptuk, amikor a növényeket egy órára az adott oldatba helyeztük. Ez összhangban van Jiang és mtsai (2016) eredményeivel, akik különböző körülmények között nevelt gyökerek esetében is megmérték a redox potenciál alakulását, és a tápoldatban tartott gyökerek esetében oxidáltabb redox állapotot figyeltek meg a táptalajon, aerob körülmények között tartott gyökerekhez

viszonyítva (Jiang és mtsai, 2016). A kísérlet sorozatunk központi kérdése volt, hogy a *R. rhizogenes*-szel való transzformálással előállított redox szenzor és az *A. tumefaciens*-szel létrehozott, a roGFP2 génre nézve minden sejtben homozigóta mutánsok gyökereiben kifejeződő roGFP2 alkalmazása redox állapot meghatározásra mennyire eltérő eredményt ad. Az ábra jól szemlélteti az ún. stabil mutánsok és a *R. rhizogenes* általi transzformáció után kifejlődő gyökerekben tranziens kifejeződő roGFP2 próbával mérhető redox potenciálok összehasonlíthatóságát. A táptalajon nevelt 5 napos stabil mutánsok és az 5 napig ozmotikum tartalmú táptalajon nevelt növények *R. rhizogenes*-indukálta járulékos gyökereiben mért redox potenciálok között a 300 mM mannitol kezelés és a 150 mM NaCl kezelés kivételével nincs szignifikáns különbség. Viszont a *R. rhizogenes*-közvetítette transzformálás során kinőtt kéthetes gyökerek ozmotikumot tartalmazó oldatba történő helyezésével történő 1 órás kezelések eredménye és a megemelt ozmotikus koncentrációjú táptalajon nőtt stabil transzformánsok redox állapota között több esetben is megfigyelhető, hogy a tápoldatos kezelés szignifikáns oxidáltabb redox állapotot eredményezett. Ebben az esetben azonban a gyökerek kora és a csíranövények nevelési körülményei mellett a kezelési mód és idő is eltért.



19. Ábra: A különböző módszerek és kezelések során mért redox potenciálok összehasonlítása. A bal oldali oszlopok a stabil mutánsokban mért redox potenciálok átlagait, a középső oszlop a *R. rhizogenes* általi transzformált növények 1 órás kezelését, a jobb oldali pedig az 5 napos kezelést ábrázolja. Az *A. tumefaciens*-közvetítette transzformációval bejuttatott roGFP2-vel kapott értékektől való szignifikáns eltérést Student-féle *t*-teszttel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Eredményeink alapján a roGFP2 gyökerek redox potenciáljának vizsgálatára történő alkalmazás esetében a stabil mutánsokat eredményező *A. tumefaciens*-közvetítette transzformációs módszert ki lehet váltani *R. rhizogenes* transzformálással. Az utóbbi alkalmazása nagyban megkönnyíti pl. különböző mutánsok esetében az egyes gének által kódolt fehérjék redox állapotra gyakorolt hatásának vizsgálatát.

6. Összefoglaló

A növényeket érő számos stresszor következtében a sejtekben különböző reakciók eredményeként ROS halmozódhat fel, ami a sejt molekuláit károsítja, nagy mennyiségben el is pusztíthatja a sejteket. Azonban ezek a molekulák fontos jelátviteli útvonalakban vesznek részt, mint szignál molekulák. Mennyiségük növekedésével a sejt redox állapota megváltozik, oxidáltabb állapotba kerül. Ennek felismerése átformálta a stresszről alkotott szemléletet: a stresszorok a ROS mennyiségének növelésével megváltoztatják a sejtek redox állapotát, különböző fiziológiai és jelátviteli válaszreakciókat beindítva. A redox állapot *in vivo* vizsgálatához előállítottak genetikailag kódolt redox próbákat, amiket génmódosítással be lehet juttatni az élő sejtekbe. *Agrobacterium tumefaciens*-szel több generáción át történő nevelés és tesztelés után létre lehet hozni az adott génre nézve homozigóta, ún. stabil mutánsokat, amik minden sejtben képesek kifejezni ezeket a redox szenzorokat. Azonban a *Rhizobium rhizogenes* közvetítette transzformálás ennél egyszerűbb módja a genetikai módosításnak, bár csak a gyökerekben fejeztethető ki a bejuttatott gén.

A módszer optimalizálását célzó kísérleteink eredményeként képesek voltunk nagy hatásfokkal, körülbelül a növények 71,5 %-ban kifejeztetni roGFP2 redox próbát. A *R. rhizogenes*-szel transzformált gyökereket 1 órás és 5 napos ozmotikus kezelésnek vetettük alá, majd összehasonlítottuk a gyökerek merisztematikus régiójában mért redox potenciálokat a stabil mutánsokkal végzett kísérletek eredményével. Az eredményeink azt mutatták, hogy mind a kezelés módjától, mind annak hosszától függően változik a redox potenciál. Az 1 órás kezelés során koncentráció- és idő függvényében oxidáltabb redox állapot alakult ki, míg az 5 napos kezelés hatására a 150 mM NaCl és 300 mM mannitol tartalmú táptalajra kiültetett növények kivételével nem tapasztalható szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt gyökerek redox állapota között. Ez valószínűleg a stresszorhoz való akklimatizáció miatt történhetett meg. Az 5 napos kezelés hatását stabil mutánsokkal végzett korábbi kísérlet eredményeivel összehasonlítva megállapítható, hogy a roGFP2 redox szenzor növénybe juttatásához a *R. rhizogenes*-mediálta transzformálás felválthatja az *A. tumefaciens* általi transzformálást a gyökerek redox állapotának vizsgálatánál.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Mainé Dr. Csiszár Jolánnak és Dr. Horváth Editnek a pályamunkám elkészítésében és a kísérletsorozat elvégzésében nyújtott segítségével és irányításukért.

Hatalmas köszönettel tartozom Tompa Bernát PhD hallgatónak a betanításomért, a kísérletek során nyújtott segítségével és végtelen türelméért.

Köszönettel tartozom a Növényi Molekuláris Csoport tagjainak, Dr. Bela Krisztinának, Hajnal Ádámnak és Porkoláb Erzsébetnek a munkám során nyújtott segítségért.

8. Irodalomjegyzék

- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20(8), 1163-1178.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Cano-Europa, E., Blas-Valdivia, V., Franco-Colin, M., & Ortiz-Butron, R. (2015). Regulation of the redox environment. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*.
- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone, I., & Costantino, P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular and General Genetics MGG*, 209, 475-480.
- Fehér A., Csiszár J., Pécsváradi A., Kolbert Zs. (2019). A növények élete : egyetemi jegyzet, 106-118.
- Gantait, S., & Mukherjee, E. (2021). Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 35-53.
- Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2015). The *agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 295-313.
- Hashida, S. N., Takahashi, H., & Uchimiya, H. (2009). The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Annals of Botany*, 103(6), 819-824.
- Heszky L.: Transzgénikus (GMO) növények - elmélet és gyakorlat (2017). Agrofórum Kiadó, Budapest. 352.
- Horváth, E., Bela, K., Holinka, B., Riyazuddin, R., Gallé, Á., Hajnal, Á., ... & Csiszár, J. (2019). The *Arabidopsis* glutathione transferases, AtGSTF8 and AtGSTU19 are involved in the maintenance of root redox homeostasis affecting meristem size and salt stress sensitivity. *Plant Science*, 283, 366-374.
- Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.
- Jiang, K., Moe-Lange, J., Hennet, L., & Feldman, L. J. (2016). Salt stress affects the redox status of *Arabidopsis* root meristems. *Frontiers in Plant Science*, 7, 174867.

- Kamiya, T., Borghi, M., Wang, P., Danku, J. M., Kalmbach, L., Hosmani, P. S., ... & Salt, D. E. (2015). The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10533-10538.
- Kapoor, D., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Rattan, A., Yadav, P., ... & Bhardwaj, R. (2015). Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 13.
- Kärkönen, A., & Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*, 112, 22-32.
- Khan, M. A., Gemenet, D. C., & Villordon, A. (2016). Root system architecture and abiotic stress tolerance: current knowledge in root and tuber crops. *Frontiers in Plant Science*, 7, 209303.
- Kong, X., Tian, H., Yu, Q., Zhang, F., Wang, R., Gao, S., ... & Ding, Z. (2018). PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-responsive AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *Cell Reports*, 22(5), 1350-1363.
- Mangano, S., Denita-Juarez, S. P., Choi, H. S., Marzol, E., Hwang, Y., Ranocha, P., ... & Estevez, J. M. (2017). Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(20), 5289-5294.
- Manzano, C., Pallero-Baena, M., Casimiro, I., De Rybel, B., Orman-Ligeza, B., Van Isterdael, G., ... & Del Pozo, J. C. (2014). The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiology*, 165(3), 1105-1119.
- Mase, K., & Tsukagoshi, H. (2021). Reactive oxygen species link gene regulatory networks during Arabidopsis root development. *Frontiers in Plant Science*, 12, 660274.
- Meyer, A. J., & Dick, T. P. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 621-650.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3).
- Nadarajah, K. K. (2020). ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5208.

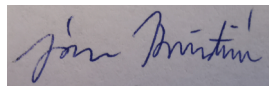
- Noctor, G., Arisi, A. C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H., & Foyer, C. H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 623-647.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Potters, G., Horemans, N., & Jansen, M. A. (2010). The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 292-300.
- Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., & Rawat, B. (2019). Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root cultures: a promising approach for production of useful metabolites. *In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 103-118). Elsevier.
- Selye, J. Életünk és a stress (1965). Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Tsakagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143(4), 606-616.
- Waidmann, S., Sarkel, E., & Kleine-Vehn, J. (2020). Same same, but different: growth responses of primary and lateral roots. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2397-2411.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

9. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Jász Krisztián Sándor hogy a 2024-es Tavaszi helyi Biológia TDK-ra benyújtott **Lúdfű gyökerek redox potenciáljának *in vivo* vizsgálata tranziens kifejeződésű roGFP2 redox próbával** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke
<i>A magok sterilizése, növények nevelése</i>	4
<i>Növények transzformálása Rhizobium rhizogenes-szel</i>	4
<i>Növények átültetése szelekciós táptalajra</i>	4
<i>Növények kezelése ozmotikumokkal</i>	4
<i>Gyökerek vizsgálata sztereo mikroszkóppal</i>	3
<i>Gyökerek vizsgálata konfokális mikroszkóppal</i>	3
<i>Gyökerekről készült képek elemzése, redox potenciál kiszámolása</i>	5
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása, értékelés</i>	5

Kelt: Szeged, 2024. április 15.



Pályamunkát benyújtó hallgató (Jász Krisztián Sándor)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Mainé Dr. Csiszár Jolán, SZTE TTIK
Növénybiológiai Tanszék)
aláírása

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.