

**Sóstressz-indukálta fiziológiai és  
molekuláris biológiai válaszok vizsgálata  
paradicsom növényben (*Solanum  
lycopersicum* L.)**

Ph.D. Disszertáció

Kovács Judit



Témavezető: Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma

Szegedi Tudományegyetem  
Növénybiológiai Tanszék

2017

## Bevezetés

A növények gyorsan képesek felfogni és reagálni a különböző környezeti változásokra. Komplex fiziológiai, biokémiai és molekuláris biológiai mechanizmusokat alakítottak ki, melyekkel képesek alkalmazkodni a különböző stresszekhez. A növényi stresszeket eredetük alapján kétféle csoportra oszthatjuk: biotikus- és abiotikus stressz. Abiotikus stresszről akkor beszélhetünk, ha valamilyen fizikai vagy kémiai behatás éri a növényt.

A sóstressz világszerte az egyik legfontosabb stresszfaktor, ami nagymértékben csökkenti a növekedést és limitálja terméshozamot. A paradicsom, *S. lycopersicum*, mezőgazdaságban széleskörben elterjedt haszonnövény, termesztése a meleg és száraz területekre jellemző, ahol egyre nagyobb problémát jelent a növekvő sótartalom nemcsak a talajban, hanem az öntözővizekben is. Emiatt egyre nagyobb figyelmet kap a sóstressz hatása a paradicsom termesztésben.

A sóstresszre adott válasz igen komplex folyamat és különböző morfológiai és fiziológiai változásokkal jár. Sóstressznek három fő hatása van: ozmotikus-, ionikus és oxidatív stresszt generál. Ha hosszabb ideig, illetve magas koncentrációban van jelen a só, akkor a  $Ca^{2+}$  szignál indukálódása, a ROS termelődése, a citoplazmatikus  $K^+/Na^+$  arány csökkenése és megfelelő proteázok aktiválódása együttesen programozott sejthalált (PCD) indukál.

A növényi hormonok központi szabályozói a növekedésnek és fejlődésnek és képesek befolyásolni a növény és környezete közti interakciót, beleértve a stresszre adott válaszokat. Az abszcizinsav (ABS) olyan fitohormon, amely különböző útvonalakon hatva fontos szerepet játszik a sóstressz csökkentésében. Jól ismert, hogy az ABS szintézise vízhiányos állapotokban megnövekedik és szabályozza a növény vízháztartását és ozmotikus stressztoleranciáját a sztómareguláción keresztül. Az ABS és cisztein proteázok kapcsolatáról azonban igen keveset tudunk, habár molekuláris és biokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy az ABS megakadályozza a gibberellinsav-indukálta PCD-t cisztein proteázok gátlásán keresztül.

A PCD egy genetikailag kódolt, az embriogenezis és egyedfejlődés során is gyakran megfigyelhető, fontos fiziológiai folyamat, mely a növények biotikus és abiotikus stresszel szembeni védekezésének szerves részét képezi. PCD során végbemegy a fehérjék degradációja, mely két fő folyamat által, proteázok, vagy a proteoszóma által történhet.

A proteázok fontos szerepet játszanak az egyedfejlődési folyamatok szabályozásában és a stresszre adott válaszok kialakításában a fehérjék körforgalmának szigorú ellenőrzésével. Annak ellenére, hogy a legtöbb sejtszintű folyamatban szerepet játszanak, még mindig igen keveset tudunk szubsztrát specifitásukról, pontos fiziológiai szerepükről vagy lokalizációjukról. Mi a cisztein proteáz családot vizsgáltuk, mely a legnagyobb proteáz család a szerin hidrolázok mellett. Két osztályáról, a vakuoláris processzáló enzimekről, illetve a papain-szerű cisztein proteázokról már kimutatták, hogy különböző PCD típusok szabályozásában szerepet játszanak.

A 26S proteoszóma egy igen bonyolult, konzervált fehérje komplex, melyet a 20S- és 19S proteoszóma épít fel. A fehérjék degradációjáért felelős katalitikus alegységek ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  és  $\beta 5$ ) a 20S proteoszóma központi kamrájában helyezkednek el. A proteoszómának jelentős szerepe van a szelektív fehérjelebontásban sejthalál és fejlődési folyamatok során.

## Célkitűzések

Munkánk során összehasonlítottuk, hogy milyen fiziológiai, biokémiai és molekuláris biológiai változások figyelhetők meg a paradicsom növények levelében, illetve gyökerében a szubletális, 100 mM NaCl- és a letális, PCD-t indukáló, 250 mM NaCl kezelés hatására.

Vizsgáltuk továbbá az ABS szerepét a különböző sókezelések alatt ABS bioszintézis mutáns (*sitiens*) paradicsomban.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan reagálnak a különböző növényi szervek az alkalmazott sókezelésekre?
2. Van-e specifikus hatása a sóstressznek a különböző fehérje degradációs útvonalakra, hogyan hat a Cys proteázokra, illetve a proteozómára?
3. Hogyan befolyásolja az ABS hiány a paradicsom gyökerének sóérzékenységét? Milyen fiziológiai, illetve molekuláris biológiai változásokat tapasztalunk a *sitiens* mutánsok gyökerében?
4. Vajon az ABS hiány hat-e a proteázok aktivitására?

## Anyagok és módszerek

### A növénynevelés

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar. "Rio Fuego" és *Solanum lycopersicum* cv. "Rajna vidéki" paradicsom növények vad típusát illetve *sitiens* mutánsát használtunk fel. A csíráztatás 3 napon keresztül sötétben, 26°C-on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben, majd 4-6 hetes korukig vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek. A tápoldat összetétele a következő volt: 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM KCl, 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001 mM MnSO<sub>4</sub>, 0.005 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.0001 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.01 mM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.02 mM Fe(III)-EDTA. A növényeket 0, 100, 250 mM NaCl oldattal kezeltük.

### Az életképesség meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban

Fluorescein diacetátot (FDA) használtunk életképesség meghatározásra Gémes és mtsai (2011) alapján. A fluoreszcencia intenzitást Zeiss Axiovert 200M típusú mikroszkóp alatt (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország), a 10-es filterszett, vagy 20HE filterszett segítségével vizsgáltuk. A felvételek elkészítésénél 5X objektívet alkalmaztunk.

### Az életképesség meghatározása elektrolit kieresztés (EL) alapján

Az elektrolit kieresztést Poór és mtsai. (2014) alapján határoztuk meg.

### Az elemtartalom meghatározása

2 g friss növényi mintát desztillált vízben történő erőteljes kétszeri mosást követően szárítószekrényben 80°C-on 24 órán át szárítottuk. A lemért száraz tömegű (SZT) mintákat 6 ml koncentrált salétromsavval roncsoltuk 20 órán keresztül, majd 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t mértünk rá elszívó fülke alatt. A mintákat roncsoló csövekbe öntöttük és 200°C-on 25 percig roncsoltuk mikrohullámú roncsolóban (MarsXpress CEM, Matthews NC, USA). A kihűlés után a mintákat 20 ml-re hígítottuk ioncserélt desztillált vízzel. Az elemek meghatározása a megfelelő kalibrációk és hígítások elkészítése után atomabszorpciós spektrométerrel (AAS, Hitachi Z-8200, Tokyo, Japan), levegő-acetilén láng alkalmazásával történt (Trivedi és Erdei 1992). A mért elemtartalmak mennyiségét μmol g<sup>-1</sup> SZT értékben adtuk meg.

### ROS és NO produkció meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban

A különböző koncentrációjú kezelések hatására bekövetkező ROS produkciót a 2',7'-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetát (H<sub>2</sub>DCFDA) fluoreszcens festéssel detektáltuk (Suhita és mtsai. 2004). Az NO termelődést 10 μM 4,5 diaminofluorescein-diacetát (DAF-2 DA) fluoreszcens festéssel detektáltuk.

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint detektálása***

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintet spektrofotométerrel mértük Horváth és *mtsai* (2015) alapján, néhány módosítással.

### ***Fehérjetartalom meghatározása***

Összfehérje tartalmat Bradford módszerrel mértünk.

### ***Proteolitikus aktivitás meghatározása***

#### ***Azokazeines módszer***

Azokazeint alkalmaztunk nem-specifikus szubsztrátként az összes proteáz aktivitás meghatározásához. Az 50 µl növényi kivonatot, 300 µl 1% azokazeinnel (w/v) és 650 µl K-foszfátpufferrel (pH 5.5) 37 °C-on 2 h-n keresztül inkubáltuk. A folyamatot 30 percig tartó 300 µl 10%-os hideg triklórecetsavas kezeléssel (TCA) állítottuk le jégen. A mintákat lecentrifugáltuk (12000 RPM, 10 perc, 4°C), majd fotometráltuk 440 nm-en (KONTRON kétsugaras spektrofotométer, Milano, Olaszország) (Pereira és *mtsai*. 2010).

#### ***Zselatin-SDS PAGE***

A proteázok aktivitásának meghatározására 20 µl fehérjemintát választottunk el 0,1%-os zselatint tartalmazó SDS-PAGE-vel (5%-os felső gél, 12,5%-os alsó gél) 90 V-on 20 percig, majd 70 V-on 120 percig (Grudkowska és Zagdanska 2010; Rossano és *mtsai*. 2011). A mintákhoz és a gélhez adott 20%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) az elválasztás után 2,5%-os Triton-X 100 oldattal mostuk, a gélek rázatása kétszer 40 percig (40 rpm, 25°C) történt. A géleket ezután inkubációs pufferbe tettük (50 mM Tris-HCl, 5m M CaCl<sub>2</sub>, 2m M MgCl<sub>2</sub>, pH 5,5) 37°C-on 16 órára. Az inkubáció után a géleket 250 ml 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel (40%-os metanol és 10%-os ecetsavat tartalmazó oldatban) festettük meg 30 percig, majd mostuk kétszer 30 percig. A géleket ezután desztillált vízbe helyeztük, majd digitalizáltuk.

### ***“Small-Scale Labelling” reakció***

#### ***Minta előkészítés***

A minták 50 mM Tris pufferben (pH 7.5, 5 mM DTT) voltak homogenizálva a proteoszóma vizsgálatához, majd 10000g-n, 10 percig, 4 °C-on centrifugáltuk.

#### ***Papain-szerű cisztein proteázok (PLCP-k) jelölése***

A 100 µg/ml fehérjekivonatot inkubáltunk 0.3 µM MV201 próbával 4 óráig szobahőmérsékleten, sötétben. Előinkubálás esetén gátlószerként 50 µM E64-t használtunk 30 percig. A reakciót kloroform/metanolos kicsapással állítottuk le (Friedman 2007). A csapadékot 1 X SDS–PAGE loading pufferben oldottuk vissza és 5 percig, 95°C-on inkubáltuk. A mintákat 12% SDS gélen (200 V/1h) futtattuk.

#### ***Proteoszóma alegységek jelölése***

A 100 µg/ml fehérjekivonatot 2 µM MV151 próbával 3 óráig inkubáltuk, más esetben 0.2 µM MVB072 próbával vagy egyszerre 0.8 µM LW124/MVB127-val 2 óráig szobahőmérsékleten, sötétben. Előinkubálás esetén gátlószerként 50 illetve 100 µM epoxomicint vagy 50 µM N3β1, N3β5-t használtunk. A reakciót GLB-vel állítottuk le és 5 percig, 95°C-on inkubáltuk. A mintákat 15% SDS gélen (200 V/1h) futtattuk.

### ***“Large-Scale Labeling” és tisztítás***

#### ***Mintaelőkészítés***

A gyökérszövetet 50 mM NaOAc pufferben (pH 6.0, 5 mM DTT) homogenizáltuk, majd 10000g-n, 10 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót 50 µl nagy kapacitású sztreptavidin agaróz gyönggyel inkubáltuk 30 percig, 4 °C-on, majd kétszer centrifugáltuk 1400 g-n 10 percig 4 °C-on volt. A fehérjekivonatot 0.22 µm filterrel tisztítottuk.

#### ***Affinitás tisztítás***

Fehérjekivonatot 5µM DCG-04 próbával 6 óráig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a jelölt fehérjéket kloroform/metanol módszerrel kicsaptuk. A csapadékot 1.2% SDS-PBS-ben oldottuk vissza, majd szonikálás után a mintákat 95 °C-on, 10 percig inkubáltuk. Hígítás után 100 µl nagy kapacitású sztreptavidin agaróz gyönggyel

inkubáltuk 2 h-ig szobahőmérsékleten. A gyöngyöket összegyűjtöttük és többszöri lépésen keresztül mostuk. A megkötött fehérjéket 95 °C-on, 20 µl 6 X GLB-ben eluáltuk. Az eluált proteinek 12%-os protein gélen szeparáltuk (200 V, 1 h), majd O/N festettük SYPRO Ruby-val. A detektálás után a géldarabokat kivágtuk, a gélemésztést követően a peptideket 10 µL 0.1 % hangyasavban visszaoldottuk és MS-sel azonosítottuk.

### ***RNS extrakció és expresszió analízis qRT-PCR-rel***

A vizsgálni kívánt gének expresszióját qRT-PCR segítségével detektáltuk SYBR green festékkel az RNS kivonása és cDNS szintézise után Chomczynsky és Sacchi (1987) valamint Horváth és mtsai (2015) módosítása szerint.

### ***IEF 2D SDS PAGE***

A jelölt és kicsapott fehérjéket UTC pufferben (8M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), 1 g AG 501-X8 Resin, 1% (v/v) ampholyte, 65 mM DTT) oldottuk vissza. Az izoelektromos fókuszálás 7 cm-es immobilizált pH gradiens (IPG 3–10 pH) stripeken történt BioRad PROTEAN i12 IEF berendezéssel. A második dimenzió kifejlesztése 15 %-os SDS gélen (200V/1h) történt.

### ***PNGaseF kezelés***

9 µl MVB072-nel jelölt mintát és Bovine Fetuint (Promega) kezeltünk 1 µl 10X glikoprotein denaturáló pufferrel 95°C-on 5 percig, majd a mintákat jégen hűtöttük. A reakcióelegy 2 µl 10X GlycoPuffer, 2 µl 10% NP40 és 6 µl H<sub>2</sub>O tartalmazott, majd 1 µl PNGase F vagy 1 µl H<sub>2</sub>O hozzáadása után a mintákat 37 °C-on, 1 h-ig inkubáltuk. A mintákat 16%-os SDS-PAGE-n futtattuk.

### ***Protein deglikoziláció***

18 µl MVB072-jelölt mintát és Bovine Fetuint (Promega) kezeltünk 2 µl 10X denaturáló pufferrel 95°C-on 10 percig, majd a mintákat jégen hűtöttük. A reakcióelegy 5µl 10X Deglycosylation Reaction puffert, 5µl 10% NP40 és 15µl desztillált vizet tartalmazott, ami 5µl Protein Deglycosylation Mix-szel volt kezelve 37 °C-on, 8 órán keresztül. A mintákat 16%-os SDS-PAGE-n futtattuk.

### ***Protein Foszfátáz kezelés***

60 µl MVB072- jelölt mintát 1M NaCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM DTT és 12.5X proteáz inhibitor tartalmazó koktéllal és 1 vagy 5 µl alkalikus foszfátázzal kezeltünk és 37 °C-on, 1 h-ig inkubáltunk. A mintákat 16%-os SDS-PAGE-n futtattuk, illetve a minta másik felét 10%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk és blottoltuk a foszforilált MAPK detektálásához. (elsődleges antitest, Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204); másodlagos antitest, Goat anti-Rabbit IgG).

### ***Bioinformatika***

Az Arabidopsis β alegység alapján BLASTp kereséseket végeztünk a paradicsom proteoszóma β alegységek azonosítására a SolGenomics adatbázisban. Ezután a β2a fehérje szekvencia szerkezetét élesztő proteoszóma Swiss Model alapján modelleztük és PyMol program segítségével importáltuk a paradicsom β2 alegységet az élesztő proteoszóma szerkezetébe.

### ***Statisztika***

A minták középértékeit Student-féle t-tesztel hasonlítottuk össze, ahol a kapott eredmények  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*), vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken különbözhetnek egymástól szignifikánsan.

## **Eredmények és kiértékelésük**

A mezőgazdaságban az egyik legnagyobb termés kiesést okozó stresszfajta a sóstressz. Egyre több kutatás foglalkozik különböző fajok sótűrésének vizsgálatával, a stressztoleráns fajok szelektálásával, valamint a sóstresszel szembeni rezisztencia fokozásával. Sókoncentrációtól függően

a növények képesek védekezni, sikeres akklimatizációt követően túlélni a környezetükben kialakuló stresszt. Ellenben, ha sóstressz időben elhúzódik, illetve a sótartalom átlép egy bizonyos koncentrációt, a növényben programozott sejthalál (PCD) indukálódhat.

Munkánk során összehasonlítottuk, hogy milyen fiziológiai, biokémiai és molekuláris biológiai változások figyelhetők meg a paradicsom növények levelében, illetve gyökerében a szubletális, 100 mM NaCl- és a letális, PCD-t indukáló, 250 mM NaCl kezelés hatására.

Munkánk során az alábbi fő eredményeket kaptuk:

1. A vizsgálatok során sóstressz hatására levélben mindig késleltetett változást tapasztaltunk a gyökérben kapott válaszreakciókhoz képest. Mivel a gyökér az elsődleges pont, ahol a növény találkozik és érzéklni képes a kialakult környezeti változást, jelen esetben a sóstresszt, ezért az itt keletkezett válaszok nagymértékben befolyásolják a növény későbbi adaptációját. A gyökér életképességét vizsgálva elmondhatjuk, hogy a 250 mM-os NaCl koncentrációnál már 6 óra elteltével egy masszív és gyors sejthalál indukciót figyelhetünk meg, ami 24 órán belül kiteljesedik, összehasonlítva a szubletális sóstressz hatásaival, mely csak 24 óra elteltével csökkentette szignifikánsan a gyökércsúcsok életképességét.
2. A reaktív oxigén formák akkumulációja (ROS robbanás) és a NO produkció maximumainak időbeli összehasonlításával egyértelműen el tudjuk különíteni, hogy a paradicsomban stressz hatására végbe fog-e menni a PCD, vagy sikeres lesz-e az akklimatizáció. Ugyanis letális sóstressz hatására már az első órában egyidejű ROS és NO csúcsot figyeltünk meg gyökérben, ellentétben a levéllel, ahol az egyidejű ROS és NO növekedést csak 6 óra után detektáltuk. Magas ROS sejtszintű károsodásokat okoz, amely fehérje karbonilációhoz, a károsodott fehérjék lebontásához illetve sejthalálhoz vezethet. Habár az NO is képes PCD-t indukálni, ez, *in vivo* általában csak a ROS egyidejű közreműködésével valósul meg. Feltehetően a magas ROS és NO akkumuláció egyidejű megjelenésének fontos szerepe van a sóstressz-indukálta PCD indukációjában szövet-specifikus módon.
3. Letális sóstressz hatására csak 24 óra után megfigyelhető volt az összfehérje tartalom csökkenése mind levélben, mind gyökérben, habár a gyökérben enyhe csökkenés már korábban észlelhető volt. Párhuzamosan a fehérje lebontással, az összes proteáz aktivitás növekedése volt megfigyelhető ugyanezen időpontokban, ami a legtöbb PCD alatt lejátszódó sejtszintű folyamattal összeköttetésbe hozható. Fontos szerepe van ennek a nitrogén újrahasonosításában, a nem megfelelő térszerkezetű, misfolded vagy károsodott fehérjék szelektív lebontásában. Általánosan megfigyelhető volt, hogy mind levélben, mind gyökérben 6 óránál fokozódik a proteázok aktivitása sóstressz alatt.
4. A proteáz aktivitás növekedés hátterének mélyebb megismerése érdekében az aktivitáson alapuló protein detektálás (ABPP) módszer segítségével tanulmányoztuk a cisztein proteázokat.

A legtöbb kutatás a Cys proteázok biotikus stresszben betöltött szerepével foglalkozik és emiatt keveset tudunk az abiotikus, ezen belül is a sóstresszben betöltött szerepükről. A papain-szerű Cys proteázok (PLCP) mind a sóstressz elleni védekezésben, mind a sejthalál indukciójában és végrehajtásában fontos szerepet tölthetnek be. Megnövekedett PLCP aktivitást figyeltünk meg letális sóstressz alatt 6 óránál. Azonostás után megállapítottuk, hogy az aktiválódott cisztein proteázok három különböző PLCP alosztályból származnak. Négy PLCP-t gyökérben, ötöt levélben azonosítottunk, melyek közül volt, amelyik szövetspecifikusan jelent meg. Génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy a C14, egy AALP-szerű és egy RD19-szerű cisztein proteáz specifikusan levélben, míg az eredetileg is gyökérspecifikusságot mutató egyik RD21A-szerű proteáz gyökérben expresszáldott felül letális sóstressz hatására 24 óra után. Késői felülexpresszáldást okozhat a növény további proteáz szükséglete. A korai órákban valószínűleg a jelenlévő, inaktivált formában jelenlévő „készenléti” proteázok elérik aktivált formájukat és így képesek kifejteni hatásukat. Másodlagos, avagy késleltetett mechanizmusként jelentkezhethet a további cisztein proteázok szintéziséhez szükséges génexpresszió fokozódás.

5. A cisztein proteázokon belül külön vizsgáltuk vakuoláris processzálo enzím (VPE) alcsaládot, melyek kaspáz-1 szerű aktivitással rendelkeznek. Bizonyítottuk a proteáz megjelölésének különböző beállításaival, hogy az alkalmazott próba valóban VPE-ket jelöl. ABPP segítségével kimutattuk, hogy a VPE-k szövetspecifikus aktivitásváltozást mutatnak. 6 óránál szignifikánsan megnőtt az aktivitásuk levélben, míg 24 óránál szignifikáns csökkenést figyeltünk meg gyökérben. A korábbi kutatások a VPE-k biotikus stresszben betöltött szerepére fókuszáltak. Jelen munkánkban kimutattuk, hogy sóstressz alatt aktivitásuk csak letális sókoncentráció hatására indukálódik, így feltételezhető, hogy szerepük van a sóstressz-indukálta proteín degradációban, a sejthalál iniciációban illetve egyéb vakuoláris enzimek aktiválódásában.
6. A letális sóstressz megváltoztatta a proteoszóma katalitikus alegységek aktivitását is 6 óránál gyökérben, levélben nem tapasztaltunk változást.  $\beta 2$  és  $\beta 5$  katalitikus alegységek aktiválódtak a sóstressz-indukálta PCD alatt, amely mind az alegységek molekulásúlya, mind izoelektromos pontja (pI) eltolódásában jelentkezett a vizsgálatok alatt. Valószínű, hogy a molekulásúlyban és pI értékben történt változás a proteoszóma szerkezetében történt változással együttesen jelentkezik. Mivel a PLCP-kben és a proteoszóma aktivitásában megfigyelt változások nem jelentkeztek szubletális sóstressz alatt, ezért feltételezhetjük, hogy valamiféle szerepet tölthetnek be a sóstressz-indukálta PCD korai szakaszában. A proteoszóma aktivitásának változása 24 óra elteltével már nem volt tapasztalható, ezért feltételezhetően egy reverzibilis folyamatot fedeztünk fel.
7. A legfontosabb változás az ABA deficiens, *sitiens* mutánsban a vad típushoz képest, hogy a szubletális, 100 mM NaCl kezelés is több olyan folyamatot indukál, melyek PCD-hez vezethetnek. Egyértelműen érzékenyebbé válik a *sitiens* mutáns alacsonyabb mértékű sóstresszre is. A gyökércsúcsi szövetek életképessége, a ROS tartalom, az NO termelődés és a

fehérje lebontás alapvetően más profilt mutattak *sitiens* gyökérben. A gyökércsúcs életképessége szignifikánsan lecsökkent nemcsak letális sóstressz, hanem szubletális sóstressz hatására is. Viszont érdekes jelenséget tapasztaltunk a membránok áteresztőképességét vizsgálva, 100 mM NaCl hatására kontrollhoz hasonló eredményt mutatott a *sitiens* gyökérszövetek elektrolit kieresztésének (EL) mértéke.

8. Fontos megjegyezni, hogy a mutánsok gyökerében normál körülmények között is már megemelkedett ROS szintet mértünk, ami tovább nőtt 100 mM sókezelés hatására, mialatt a NO tartalom csökkent *sitiens* gyökérben. Korábban egyértelmű kapcsolatot fedeztek fel ROS robbanás, a plazmamembrán áteresztőképességének megváltozása és a proteázok aktiválódása között. Meglepő módon, ABA hiány esetén a megnövekedett EL nem szükséges a proteázok aktivitásához. Ugyanis vadtípushoz képest *sitiens* gyökérben szubletális sókoncentráció alatt az EL nem változott, viszont szignifikánsan csökkent a fehérjetartalom és megnövekedett az összes proteáz aktivitást.
9. Számos proteáz különbözőképpen aktiválódik mind a vad típus, mind a *sitiens* gyökérben. Fontos megjegyezni, hogy sóstressz hatására bizonyos cisztein proteázok (~34 és 28 kDa-nál) aktivitása nagymértékben megnövekszik *sitiens* gyökérben, ami utalhat arra, hogy letális sóstressz hatására az ABS specifikusan gátolhatja bizonyos cisztein proteázok aktivitását, ezáltal a fehérje degradálódást. Hasonló tendenciák figyelhetők meg magasabb molekulatömegű proteázok esetében is, ami tovább erősíti azon feltételezésünket, miszerint az ABS-nak jelentős szerepe lehet a proteolízis gátlásában, különösképpen szubletális sóstressz hatására ezzel elősegítve a növény túlélését alacsony sóstressz alatt.

## Összefoglalás

Fiziológiai vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a gyökérben már az első órában komoly változások mennek végbe sóstressz hatására, ami PCD-t indukál. A gyökér, mint elsődleges védelmi vonal sokkal érzékenyebb volt sóstresszre, mint a levél, ez megmutatkozott az életképesség, a membránkárosodás korai csökkenésében, a  $K^+/Na^+$  arány esésében és a ROS/NO egyidejű korai változásában 250 mM NaCl kezelés után.

Proteomikai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az összfehérje tartalmat és az összproteáz aktivitást vizsgálva nincs szervspecifikus válasz, egyszerre 24 óránál szignifikánsan csökken a fehérjetartalom, illetve 6 óránál szignifikánsan nő a proteolitikus aktivitás mind levélben, mind gyökérben letális sókezelést követően.

Különböző enzimosztályokat vizsgálva egyértelmű szervspecifikus válaszokat kaptunk, mind a PLCP-k azonosítását, mind a VPE-k aktivitását figyelembe véve letális sókezelést követően.

A proteoszóma csak gyökérben mutatott drasztikus profilváltozást és kimutattuk, hogy a  $\beta 2$  és  $\beta 5$  katalitikus alegység aktivitása megnő letális sóstressz hatására és komoly szerkezeti változást tapasztaltunk, negatív izoelektromos pont, illetve pozitív molekulásúly eltolódásában, amely reverzibilis jelleget mutatott.



A harmadik nagy témakörben, ABS hiányt vizsgáltunk sóstressz alatt 6 óránál gyökérben. Bizonyítottuk, hogy már szubletális sókezelés komoly életképesség csökkenést okoz gyökérben ABS hiányában, illetve szignifikáns ROS emelkedést, párhuzamosan NO termelődés csökkenését tapasztaltuk. Alacsony sókezelés is már fehérjetartalom csökkenést és párhuzamosan összproteáz aktivitás növekedését eredményezte. A PLCP osztály vizsgálata során kimutattuk, hogy bizonyos PLCP-k ABS-hiányában aktiválódnak. Feltételezhetően ABS fontos szerepet játszhat bizonyos Cys proteázok gátlásában szubletális sóstressz alatt, amellyel a sóstressznek kitett növény túlélését segíti elő.

## Publikációs lista

### *Disszertációhoz kapcsolódó cikkek*

Kovács J, Poór P, Kaschani F, Chandrasekar B, Hong T, Misas-Villamil J, Xin BT, Kaiser M, Overkleef H, Tari I and van der Hoorn RAL (2017) Proteasome activity profiling uncovers alteration of catalytic  $\beta$ 2 and  $\beta$ 5 subunits of the stress-induced proteasome during salinity stress in tomato roots. *Frontiers in Plant Science* 8:107. (IF: 4.495)

Kovács J and van der Hoorn RAL (2016) Twelve ways to confirm targets of activity-based probes in plants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24:3304-3311. (IF: 2.923)

Poór P, Borbély P, Kovács J, Papp, A, Szepesi Á, Takács Z and Tari I (2014) Opposite extremes in ethylene/nitric oxide ratio induce cell death in cell suspension culture and in root apices of tomato exposed to salt stress. *Acta Biologica Hungarica* 65: 428-438, DOI: 10.1556/ABiol.65.2014.4. (IF: 0.97)

### *További megjelent publikációk*

Misas-Villamil JC, Van der Burgh AM, Grosse-Holz F, Pages M, Kovács J, Kaschani F, Schilasky S, Emron Khan Emon A, Ruben M, Kaiser M, Overkleef HS and van der Hoorn RAL (2017) Subunit-selective proteasome activity profiling uncovers uncoupled proteasome subunit activities during bacterial infections. *The Plant Journal* TPJ-00974-2016. (IF: 5.468)

Shindo T, Kaschani F, Yang F, Kovács J, Tian F, Kourelis J, Hong TN, Colby T, Shabab M, Chawla R, Kumari S, Ilyas M, Hörger AC, Alfano JR and van der Hoorn RAL (2016) Screen of non-annotated small secreted proteins of *Pseudomonas syringae* reveals a virulence factor that inhibits tomato immune proteases. *PLoS Pathogens*. 12: e1005874. (IF: 7.64)

Kovács J, Péter Poór, Szepesi Á and Tari I (2016) Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biologica Hungarica* 67: 148-158. (IF: 0.605)

Poór P, Kovács J, Borbély P, Takács Z, Szepesi Á and Tari I (2015) Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant Never ripe and wild type tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97: 313-322. (IF: 2.93)

Poór P, Kovács J, Szopkó D and Tari I (2013) Ethylene signaling in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma* 250: 273-284. (IF: 3.171)

Tari I, Guóth A, Benyó J, Kovács J, Poór P and Wodala B (2010) The roles of ABA, reactive oxygen species and nitric oxide in root growth during osmotic stress in wheat: comparison of a tolerant and a sensitive variety. *Acta Biologica Hungarica* 209-216. (IF: 0.793)

## Declaration

I the undersigned Professor Renier A. L. van der Hoorn, certify that Judit Kovács contributed to the implementation of the following publications "Proteasome activity profiling uncovers alteration of catalytic  $\beta 2$  and  $\beta 5$  subunits of the stress-induced proteasome during salinity stress in tomato roots" and "Twelve ways to confirm targets of activity-based probes in plants".

The above mentioned scientific evidences have not been published elsewhere, so far, and it is not going to be used by other PhD candidates

Oxford, ...10... 3... 2017



Professor Renier A. L. van der Hoorn (Supervisor, Corresponding author)



Judit Kovács (doctoral (Ph.D.) candidate)

## Declaration

I, the undersigned Dr. Miklósné Görgényi Dr. Irma Tari, certify that Judit Kovács contributed to the implementation of the following publication "Opposite extremes in ethylene/nitric oxide ratio induce cell death in cell suspension culture and in root apices of tomato exposed to salt stress".

The above mentioned scientific evidences have not been published elsewhere, so far, and it is not going to be used by other PhD candidates.

Szeged, .....

.....

Dr. Miklósné Görgényi Dr. Irma Tari (Supervisor, Corresponding author)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Judit Kovács', is written over a horizontal dotted line.

Judit Kovács doctoral (Ph.D.) candidate