

Növényi glutation peroxidáz enzimek vizsgálata lúdfűben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Bela Krisztina

Témavezető:

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Növénybiológiai Tanszék

SZTE TTIK



Szeged

2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Környezeti stressz hatások; só- és ozmotikus stressz	6
2.2. Oxidatív stressz és reaktív oxigénformák	7
2.3. Lipidperoxidáció	8
2.4. Antioxidáns védelmi rendszer.....	9
2.4.1. Antioxidáns enzimek	9
2.4.2. Nem-enzimatis antioxiánsok.....	11
2.5. Redox állapöt, redox potenciál és detektálásuk növényekben.....	12
2.6. A glutation peroxidázok.....	14
2.6.1. A glutation peroxidázok szerkezete	15
2.6.2. A növényi glutation peroxidázok.....	15
2.6.3. Glutation peroxidáz-szerű enzimek lúdfűben	18
3. Célkitűzés.....	22
4. Anyagok és módszerek	23
4.1. Felhasznált növényi anyag.....	23
4.2. Növénynevelési körülmények.....	24
4.2.1. Hidropónikus kultúrában nevelt növények	24
4.2.2. Talajban nevelt növények	25
4.2.3. Táptalajon nevelt növények	25
4.3. Növekedési paraméterek meghatározása	26
4.4. Életképesség meghatározása és reaktív oxigénformák detektálása fluoreszcens mikroszkóppal.....	27
4.5. Hidrogénperoxid tartalom meghatározása	28
4.6. Lipidperoxidáció mértékének detektálása.....	28

4.7. Antioxidáns enzimek aktivitásának meghatározása.....	29
4.7.1. Tioredoxin peroxidáz	29
4.7.2. Glutation peroxidáz.....	29
4.7.3. Glutation transzferáz	30
4.7.4. Gvajakol peroxidáz	30
4.7.5. Aszkorbát peroxidáz	30
4.7.6. Kataláz	30
4.8. Nem-enzimatis antioxiáns tartalom meghatározása.....	31
4.8.1. Aszkorbát tartalom.....	31
4.8.2. Glutation tartalom	31
4.9. Glutation függő redox potenciál meghatározása.....	32
4.10. Génkifejeződés vizsgálata való idejű kvantitatív polimeráz lánreakció segítségével (RT-qPCR).....	33
4.11. Az AtGPXL fehérjék biokémiai jellemzése	34
4.11.1. Konstrukciók előállítása.....	34
4.11.2. Rekombináns fehérjék tisztítása	34
4.11.3. Szubsztrát specifikas meghatározása	35
4.12. Promóter analízis	36
4.13. Korrelációs analízis.....	36
4.14. Statisztikai analízis.....	37
5. Eredmények	38
5.1. Rekombináns GPXL fehérjék aktivitása.....	38
5.2. <i>Atgpxl</i> T-DNS inszerciós mutánsok fiziológiai vizsgálata	40
5.3. <i>Atgpxl2</i> és <i>Atgpxl3</i> mutánsok abiotikus stresszvászának részletesebb vizsgálata	51
5.4. Rekombináns AtGPXL enzimek jelátvivő szerepének vizsgálata.....	60
5.5. AtGPXL2 és -3 enzimek szerepének vizsgálata a redox állapot fenntartásában	62
6. Eredmények értékelése	65

6.1. A rekombináns AtGPXL2, AtGPXL3 és AtGPXL8 fehérjék a különböző peroxidok bontásánál előnyben részesítik a tioredoxin elektron donort.....	65
6.2. Az <i>Atgpxl</i> mutánsok csökkent TPOX aktivitását más antioxidánsok képesek kompenzálni só- és ozmotikus stressz esetén	66
6.3. Az AtGPXL2 és AtGPXL3 izoenzimek antioxidáns funkciójuk mellett befolyásolhatják a redox állapotot több abiotikus stresszválasz esetén.....	68
6.4. Az AtGPXL enzimek részt vehetnek jelátviteli folyamatokban.....	71
6.5. Az AtGPXL2 és AtGPXL3 enzimeknek szerepe van a sejten belüli redox állapot szabályozásában.....	72
7. Összefoglalás	73
8. Summary	75
9. Irodalomjegyzék	77
Publikációs lista	87
Nyilatkozat.....	90
Köszönetnyilvánítás.....	91
Mellékletek	92

Rövidítések jegyzéke

ABS: abszcizinsav	LOOH: lipid hidroperoxid
APX: aszkorbát peroxidáz	MDA: malondialdehid
ASC: redukált aszkorbát	MES/KCl: 2-(N-morfolino)- etánszulfonsav/kálium klorid
CDNB: 1-klór-2,4-dinitrobenzol	MS: Murashige-Skoog
CHP: kumén hidroperoxid	MYB: myeloblastosis család transzkripció faktor
DHA: dehidroaszkorbát	MYC: myelocytomatosis család transzkripció faktor
DHE: dihidroetídium	NCED: 9-cisz-epoxikarotin dioxigenáz
DPS: 4,4'-dipiridil-diszulfid, Aldritiol-4	NTR: NADPH-függő tioredoxin reduktáz
DREB: DRE (dehydration-responsive element) kötő fehérje	•OH: hidroxil gyök
DTT: ditiotritol	O₂^{•-}: szuperoxid gyökanion
E_{hc}: fél cella redukciós potenciál	PEG: polietilén glikol 6000
E_{GSH}: glutation függő redox potenciál	PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid
FDA: fluoreszcein diacetát	POX: gvajakol peroxidáz
FT: friss tömeg	PVPP: polivinil-polipirrolidon
GPOX: glutation függő peroxidáz aktivitás	qRT-PCR: kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
GPX: glutation peroxidáz	roGFP2: redox szenzitív zöld fluoreszcens fehérje
GPXL: glutation peroxidáz-szerű enzim	ROS: reaktív oxigénformák
GR: glutation reduktáz	TBH: terc-butil-hidroperoxid
GSH: redukált glutation	TCA: triklórecetsav
GSSG: oxidált glutation	TPOX: tioredoxin függő peroxidáz aktivitás
GST: glutation transzferáz	TRIS: trisz-hidroximetil-amino-metán
H₂DCFDA: 2'-7'- diklordinhidrofluoreszcein diacetát	TRX: tioredoxin
HO₂[•]: hidroperoxi gyök	v_{max}: maximális reakciósebesség
KAT: kataláz	
K_M: Michaelis-Menten állandó	
L•: lipid gyök	
LOO•: lipidperoxil gyök	

1. Bevezetés

A klímaváltozás során bekövetkezett hatások miatt a növényélettani kutatások terén kiemelt jelentősége lett a stresszélettani kutatásoknak. A szélsőséges időjárási események gyakoribbá válása súlyos veszteségeket okoz a mezőgazdasági termelésben. A növények folyamatosan ki vannak téve a környezet hatásainak, melyek egy részének jelentős változása káros lehet számukra, stresszorként jelentkeznek, stresszfolyamatokat vált ki bennük. A környezeti stresszhatások következtében másodlagos stresszként oxidatív stressz is kialakul. Ennek során a reaktív oxigénformák felhalmozódása által könnyen felborulhat a növények redukciós állapota, sérülhetnek a membránok, fehérjék és nukleinsavak, ezáltal károsodik növekedésük, fejlődésük. Hogy ezt elkerüljék, a növények az antioxidáns védelmi rendszer teljes arzenáljával vértetik fel magukat.

A növényi glutathion peroxidáz-szerű enzimek (GPXL) az antioxidáns enzimek tagjai, melyek tioredoxin (vagy glutathion) redukáló komponens segítségével képesek a H_2O_2 és szerves hidroperoxidok bontására vízzé, vagy a megfelelő alkoholokká. Leginkább az állati foszfolipid hidropoxid glutathion peroxidázokhoz hasonlítanak (PHGPX), azonban katalitikus helyükön azoktól eltérően nem szelenociszteint, hanem ciszteint tartalmaznak. A cisztein kémiai tulajdonságai miatt a szelenociszteint tartalmazó enzimekével összevetve aktivitásuk is alacsonyabb. Ez felveti a lehetőséget, hogy esetleg az enzimatisz antioxidáns funkciójukon kívül más folyamatokban is szerepük lehet. *Arabidopsisban thaliana*-ban 8 izoenzimet azonosítottak, melyek különböző sejtorganelumokban lokalizálódnak, megtalálhatóak a citoplazmában, sejtmagban, a plazmamembránhoz kötve, a mitokondriumban, kloroplasztisban és a Golgi-ban is. A lúdfű az élettani kutatások gyakran használt modellnövénye, mivel genetikai háttere ismert, és számos mutáns áll rendelkezésre. Kísérleteink során *Atgpxl* inszerciós mutáns növényeket használtunk az AtGPXL fehérjék stresszválaszban betöltött szerepének vizsgálatához. Összehasonlítottuk a vad típusú (Col-0) és mutáns növények károsodását abiotikus stresszhatásra a H_2O_2 és malondialdehid (MDA) tartalmakon keresztül, valamint megvizsgáltuk a növényekben néhány, peroxid bontásban vagy detoxifikációban fontos antioxidáns enzim aktivitását, valamint nem-enzimatisz antioxidáns tartalmakat. Kiválasztott *Atgpxl* mutáns növényekben kifejeztetett roGFP2 redox szenzor segítségével tanulmányoztuk egy-egy GPXL hiányának hatását a glutathion redox potenciál (E_{GSH}) alakulására. A GPXL fehérjék biokémiai tulajdonságainak megismeréséhez heterológ rendszerben termeltetett, majd tisztított enzimeken végeztünk kísérleteket.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Környezeti stressz hatások; só- és ozmotikus stressz

Az élőlényeket folyamatosan változó környezeti hatások érik, melyek negatívan hathatnak a növekedésükre, fejlődésükre, szaporodásukra. A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást, pusztulást okoz (Larcher, 1987). A stresszfaktor pedig az a hatás, amely a stresszválaszt kiváltja (Kranner és mtsai., 2010). A környezeti stressz hatások okozzák a legnagyobb megjósolhatatlan mezőgazdasági termelés kiesést világszerte. Nem csupán azzal, hogy hatással vannak a már meglévő termőföldek hozamára, hanem akadályt jelentenek új, kiaknázatlan területek mezőgazdasági hasznosításánál. Az állatokkal ellentétben a növények nem képesek helyváltoztatásra, így nem tudnak elmenekülni egy-egy káros hatás elől, meg kell birkóznuk a különböző káros tényezőkkel.

A környezeti stressz faktorokat két nagyobb csoportba sorolhatjuk. Biotikus stressz hatásról akkor beszélünk, mikor egy másik élőlényrel, például baktériummal, gombával, növényevővel, rovarral vagy parazitával kerül kapcsolatba a növény. Ezek átlagosan 40%-kal csökkentik a potenciális terméshozamot évente a nagy mennyiségben alkalmazott növényvédőszer ellenére (Pimentel, 1997).

Az egyéb, nem élőlény által okozott negatív hatások esetén abiotikus stresszről beszélünk. Ilyen faktorok lehetnek a vízellátottság, a sótartalom, a szélsőséges hőmérséklet és besugárzás, fémek, kemikáliák, szennyező anyagok, illetve mechanikai hatások. Ezek közül a legjelentősebb hatással a vízellátottság bír a mezőgazdasági termelésre, mind a túl sok víz (áradás), és a túl kevés víz (szárazság) termésvesztéshez vezet. A World Resources Institute (WRI) elemzése szerint 2013-ban a termőföldek 28%-át érte erős, illetve szélsőséges szárazság stressz. Mindez csupán egy átlag, ha növényenként vizsgáljuk, ez a kukoricaföldeknek 35%-át, a búzaföldeknek 43%-át, a gyapottföldeknek pedig 57%-át érintette (Reig és mtsai., 2013). Hogy megelőzzék a termésvesztést, a gazdálkodók öntözéshez folyamodtak, ami esetenként a talajvíz magas sótartalma (leginkább nátrium-klorid) miatt a terület szikesedéséhez vezetett. A legtöbb haszonnövény érzékeny a talaj magas sótartalmára. 2010-ben a mezőgazdasági területek közel 33%-át érintette a szikesedés, és ez az arány évente mintegy 10%-kal növekszik (Jamil és mtsai., 2011).

A só- és ozmotikus stressz hasonló hatással van a növényekre, végső soron gátolják a növekedést és fejlődést (Fuji és Zhu, 2009; López-Pérez és mtsai., 2009). Azonban a só stressz ezen kívül még ion toxicitást is okoz a felhalmozódó nátrium és klorid ionok miatt, melyek gátolják az enzimátikus reakciókat, negatív hatással vannak a fotoszintézisre (Cramer és Nowak, 1992; Ashraf és Harris, 2004). Különböző növények eltérően reagálnak a só stresszre. Glikofita növények (mint a legtöbb takarmánynövény vagy a lúdfű) nehezebben tolerálják a talaj magas sótartalmát, míg a sótűrő növények jobban alkalmazkodtak ehhez, képesek a nátrium- és klorid ionok kompartmentalizálására, vagy éppen kiválasztására (Munns, 2002). Számos gén aktiválódik a stresszválasz során fehérje-fehérje interakciók, transzkripciók faktorok, és promóter elemek közreműködésével (Ciarmiello és mtsai., 2011). Több útvonal függetlenül működik különböző stressz hatására, abszcizinsav (ABS)-függő vagy -független módon, ami a stresszválaszban egy hatalmas hálózatot alkot (Liu és mtsai., 1998; Abe és mtsai., 2003; Dombrowski, 2003).

2.2. Oxidatív stressz és reaktív oxigénformák

Minden környezeti stressz előbb utóbb oxidatív stresszt eredményez. Az oxidatív stressz egy olyan folyamat, melynek során reaktív oxigén formák (ROS-ok) keletkezése, vagy az ezeket egyensúlyban tartó antioxidáns folyamatok felborulása által a ROS-ok felhalmozódnak, melyek a sejtalkotó biomolekulák károsodását okozzák (Foyer és Noctor, 2005; Das és Roychoudhury, 2014; Demidchik, 2015).

A ROS-ok olyan elemek, melyek tartalmaznak egy vagy két atom aktivált oxigént, de nem feltétlenül párosíthatlan elektront tartalmazó szabad gyökök. A ROS által okozott stressz a Föld élőlényeit a fotoszintetizáló szervezetek megjelenése óta érinti, melyek 2,7 milliárd éve CO₂-ból és H₂O-ból O₂-t állítanak elő (Halliwell, 2006; Dowling és Simmons, 2009). A fluor után az oxigén a második legnagyobb elektonegativitással rendelkező elem, tehát erős oxidálószer. A légköri oxigén O₂ molekula formában van jelen, amely két párosíthatlan elektronnal rendelkezik, tehát definíció szerint szabadgyök, de stabil, nem reaktív molekula. Ahhoz, hogy reaktívvá váljon, energiára van szükség sugárzás, vagy nagy energiájú elektron által, majd biokémiai reakciók sorozatával átalakulhat különböző ROS-sá. Ilyen reaktív formák például a szinglet oxigén (¹O₂), a szuperoxid gyökanion (O₂^{•-}), a hidroxil gyök (•OH), a nitrogénoxid gyök (NO•), a peroxinitrit anion (ONOO⁻), vagy a hidrogén-peroxid (H₂O₂) (Apel és Hirt, 2004; Halliwell, 2006).

$O_2^{\cdot-}$ keletkezik akkor, ha a O_2 egy elektront vesz fel, például a fotoszintetikus elektrontranszportláncból, vagy a NADPH oxidáz enzim aktivitása által. Ez már reaktív molekula, de általában nem károsít makromolekulákat, viszont képes protonnal való reakcióra, ezáltal hidroperoxigyököket képezve ($HO_2^{\cdot-}$). Ez stabilabb molekula, még reaktívabb. Két $HO_2^{\cdot-}$ molekula reakciója által (szuperoxid dizmutáció) keletkezik H_2O_2 és O_2 . A H_2O_2 a legstabilabb ROS, a féléletideje azonban körülbelül 1 ms a sejtekben aktívan működő antioxidáns enzimek (kataláz és peroxidázok) működése miatt. Viszont ez a stabilitás alkalmassá teszi jelátviteli szerepére a stresszválaszban, képes viszonylag nagyobb távolságot megtenni, az aquaporinokon keresztül membránon átjutva (Apel és Hirt, 2004; Foyer és Noctor, 2009; Noctor és mtsai., 2014; Halliwell és Gutteridge, 2015; Hossain és mtsai., 2015). Mennyisége az apoplasztban a legjelentősebb, ahol kevesebb a lebontó antioxidáns enzim, illetve itt *de novo* keletkezik nagy mennyiségben a már említett szuperoxid dizmutáció, valamint a III-as típusú peroxidázok aktivitása következtében (Bolwell és mtsai., 2002; Cosio és Dunand, 2009). Az úgynevezett Haber-Weiss reakció által a H_2O_2 -ből és $O_2^{\cdot-}$ -ből, $\bullet OH$ és OH^- keletkezik oxigén felszabadulása mellett. $\bullet OH$ keletkezhet a Fenton reakció során is, mely esetben a H_2O_2 -ből szintén $\bullet OH$ és OH^- jön létre mialatt egy átmeneti fémion oxidálódik ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ -á, $Cu^+ \rightarrow Cu^{2+}$ -á) (Sharma és mtsai., 2012; Ayala és mtsai., 2014). A $\bullet OH$ nagyon reaktív ROS, elsődleges károsítója oxidatív stressz során a fehérjéknek, nukleinsavaknak, és persze a lipideknek (Das és Roychoudhury, 2014; Demidchik, 2015).

2.3. Lipidperoxidáció

A lipidperoxidáció folyamatának elindításában leginkább a $\bullet OH$ és a $HO_2^{\cdot-}$ játszanak szerepet (Ayala és mtsai., 2014). A folyamat 3 lépésre bontható: iniciáció, propagáció és termináció (Yin és mtsai., 2011; Sharma és mtsai., 2012; Farmer és Mueller, 2013). Iniciáció során ezek a reaktív $\bullet OH$ és a $HO_2^{\cdot-}$ (illetve egyéb ROS) molekulák protont vonnak el a lipid molekula metilén csoportjától, így lipid gyök keletkezik ($L^{\cdot}$). Erre a membránban található telítetlen foszfolipid molekulák hajlamosabbak a kettős kötés miatt. Ezt követően a $L^{\cdot}$ molekula átrendeződik konjugált diénné. A propagáció során ez a $L^{\cdot}$ oxigénnel reagál, és lipid peroxilgyök ($LOO^{\cdot}$) keletkezik, amely képes protont elvonni másik lipid molekulától, ezáltal egy láncreakciót indítva el. A keletkező protonált $LOO^{\cdot}$ egy lipid hidroperoxid ($LOOH$) molekula. $LOOH$ redukált átmeneti fémekkel való reakciója során lipid alkoxil gyök keletkezik ($LO^{\cdot}$), ami szintén a láncreakciót serkenti, maga is képes proton elvonására (Catalá, 2006; Repetto és mtsai., 2012; Sharma és mtsai., 2012). A lipidperoxidáció a membránok

károsodásához, a membránban található transzport fehérjék és ioncsatornák funkciók sérüléséhez vezet (Repetto és mtsai., 2012; Sharma és mtsai., 2012; Farmer és Mueller, 2013). Végül a lipidperoxidáció folyamata terminációs fázisba lép, másodlagos termékek, aldehidek keletkeznek nem-enzimatis peroxidációs folyamatban. Ilyen termékek például a 4-hidroxi-2-nonenál, 4-hidroxi-2-hexenál, az akrolein, vagy a malondialdehid (MDA) (Esterbauer és mtsai., 1991; Farmer és Mueller, 2013; Ayala és mtsai., 2014).

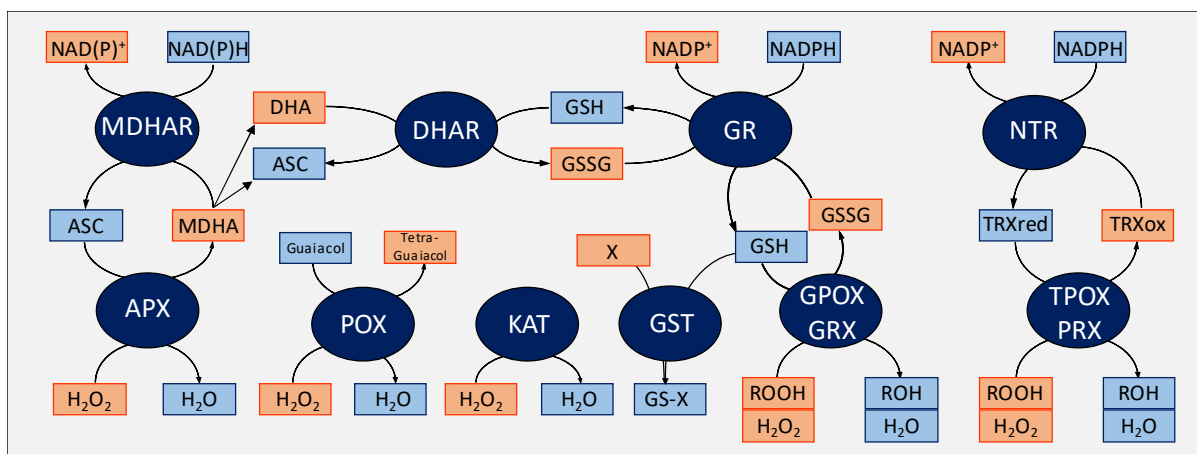
2.4. Antioxidáns védelmi rendszer

Az antioxidáns védelmi rendszer védi a növényeket az oxidatív stressz okozta károsodások ellen. Nagyon fontos, hogy egy érzékeny egyensúly létezik a ROS-ok termelődése és lebontása között (Gill és Tuteja, 2010). ROS alacsony szintű jelenléte fontos a jelátvitelben betöltött szerepük miatt (Palmer és Paulson, 1997), így a túlzott antioxidáns aktivitás sem előnyös, de a magas ROS szint a már korábban tárgyalt oxidatív stresszt okozva káros a sejtekre. A védelmi rendszernek vannak enzimatis, illetve nem-enzimatis összetevői is, melyek eltérő módon, de minden sejtalkotóban jelen vannak (Ahmad és mtsai., 2010; Das és Roychoudhury, 2014).

2.4.1. Antioxidáns enzimek

Az antioxidáns enzimek közé tartoznak az aszkorbát-glutation ciklus enzimek, melyek az aszkorbát peroxidáz (APX), dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR), monodehidroaszkorbát reduktáz (MDHAR), glutation reduktáz (GR). Ezen kívül egyéb peroxidázok, mint gvajakol peroxidáz (POX), glutation peroxidáz (GPX), glutation peroxidáz-szerű enzim (GPXL), vagy a detoxifikálásban szerepet játszó glutation transzferáz (GST). Ezen kívül a kataláz (KAT), szuperoxid dizmutáz (SOD), peroxiredoxin (PRX) (**1. ábra**). Ezek az enzimek különböző stresszválaszban eltérően aktiválódhatnak az egyes kompartmentumokban (Ahmad és mtsai., 2010; Gill és Tuteja, 2010; Sharma és mtsai., 2012; Das és Roychoudhury, 2014).

A SOD-ok (EC 1.15.1.1.) az egyik leghatékonyabb antioxidáns enzimek, feladatuk a $O_2^{\cdot-}$ H_2O_2 -dá való dizmutációja. Megtalálhatók a kloroplasztisban, mitokondriumban, peroxiszómában, citoszolban egyaránt (Jackson és mtsai., 1978). Ezek metalloenzimek, tehát egy fém kofaktort tartalmaznak a katalitikus helyükön, mely alapján csoportosíthatjuk őket réz/cink- (Cu/ZnSOD), mangán- (MnSOD), és vas-SOD (FeSOD) izoenzimekre (Bowler és mtsai., 1992; Mittler, 2002). Lúdfüben három Cu/ZnSOD, egy MnSOD és három FeSOD izoenzimet detektáltak (Kliebenstein és mtsai., 1999). Az aktivitásuk által keletkező H_2O_2 -t ezt követően több enzim is képes elbontani lokalizációtól és mennyiségtől függően.



1. ábra Az antioxidáns védelmi rendszer kiemelt enzimeinek működési hálózata Gill és Tuteja (2010), valamint Foyer és Noctor (2011) alapján. APX: aszkorbát peroxidáz, ASC: redukált aszkorbát, DHA: dehidroaszkorbát, DHAR: dehidroaszkorbát redukáz, GPOX: glutation peroxidáz aktivitás, GR: glutation redukáz, GRX: glutaredoxin, GSH: redukált glutation, GSSG: oxidált glutation, GST: glutation transzferáz, KAT: kataláz, MDHA: monodehidroaszkorbát, MDHAR: monodehidroaszkorbát redukáz, NTR: NADPH-függő tioredoxin redukáz, POX: gvajakol peroxidáz, PRX: peroxiredoxin, ROH: szerves alkohol, ROOH: szerves hidroperoxid, TPOX: tioredoxin peroxidáz aktivitás.

Ezek közül az egyik típus a KAT-ok (EC 1.11.1.6), melyek az elsőként felfedezett és jellemzett antioxidáns enzimek. Struktúrájuk szerint tetramer felépítésű hem-tartalmú fehérjék, melyek feladata a H_2O_2 vízzé és O_2 -né való közvetlen dizmutációja, de szerves peroxidok nem szubsztrátjaik. Főleg a peroxisómákban vannak jelen, megtalálhatók azonban a kloroplasztiszbán, mitokondriumban, citoszolban is (Mhamdi és mtsai., 2010). Arabidopsisban három izoenzimet azonosítottak, melyek szervspecifikus kifejeződést mutattak (Du és mtsai., 2008).

A H_2O_2 detoxifikálásában játszhatnak szerepet a szintén hem-tartalmú POX-ok (EC 1.11.1.7). fehérjék. Aromás vegyületek (például gvajakol vagy pirogallol) oxidációja mellett képesek a H_2O_2 redukciójára a citoszolban és vakuólumban, de a sejtfalban is. Stresszválaszban betöltött szerepük mellett fontos feladatuk van több bioszintetikus folyamatban, mint például a sejtfa lignifikációja, etilén bioszintézise, vagy az indolecetsav lebontása (Asada, 1999; Tayefi-Nasrabadi és mtsai., 2011). Magasabbrendű növényekben nagy számú POX izoenzim fordul elő, Arabidopsisban 73-at azonosítottak (Tognolli és mtsai., 2002).

Az antioxidánsok között a hem-tartalmú APX-ek rendelkeznek a legmagasabb affinitással H_2O_2 szubsztrát felé (Wang és mtsai., 1999; Ahmad és mtsai., 2010; Gill és Tuteja, 2010), melyek aszkorbát oxidálása mellett végzik a H_2O_2 redukcióját vízzé. (EC 1.11.1.11). A különböző izoformái megtalálhatók a kloroplasztiszbán, mitokondriumban, peroxisómában és a citoplazmában membránkött, vagy szolubilis változatban (Shigeoka és mtsai., 2002; Caverzan és mtsai., 2012). Arabidopsisban kilenc APX izoenzimet azonosítottak (Mittler és mtsai., 2004) Az általuk oxidált aszkorbát visszaredukálását végzik az MDHAR (EC 1.6.5.4)

és DHAR (EC 1.8.5.1) enzimek (Hossain és Asada, 1985; Ushimaru és mtsai., 1997). Míg az MDHAR NAD(P)H-t használ elektrondonorként a monodehidroaszkorbát redukálásához, addig a DHAR redukált glutation (GSH) oxidálása mellett végzi a dehidroaszkorbát regenerálását. A keletkezett oxidált glutationt (GSSG) egy a redox szabályozásban nagyon fontos flavoenzim, a GR (EC 1.6.4.2) képes visszaredukálni NADPH elektrondonort használva fel. Habár ez az enzim megtalálható a citoplazmában, mitokondriumban, peroxiszómában és a kloroplasztisban egyaránt, mégis a legjelentősebb aktivitása a kloroplasztisban van (Edwards és mtsai., 1990).

A szerves hidroperoxidok (ROOH) lebontásában játszanak szerepet egyes glutation peroxidáz aktivitással (EC 1.11.1.12 és EC 1.11.1.9) rendelkező GST enzimek. Ennek során GSH-t használnak elektrondonorként, miközben a ROOH-t megfelelő alkoholokká (ROH) alakítják (Dixon és mtsai., 2009). A GST-k (EC 2.5.1.18) másik fő feladata a detoxifikálás, melynek során a sejt számára káros anyagokhoz GSH-t kapcsolnak, majd az így létrejövő molekulakomplex a vakuólumba kerül egy ABC-transzporterrel keresztül. Arabidopsisban 54 szolubilis, és egy membránkötött GST található, melyek minden sejtorganelumban jelen vannak (Dixon és mtsai., 2010; Dixon és Edwards, 2010).

Mind H_2O_2 -t, mind pedig ROOH-t redukálni képes enzimek a GPX-ek (EC 1.11.1.9, EC 1.11.1.12), vagy a GPXL-ek (EC 1.11.1.15), amelyek a későbbiekben (2.6. A glutation peroxidázok) részletesebb ismertetésre kerülnek.

2.4.2. Nem-enzimatis antioxiidánsok

Az antioxiidáns védelmi rendszer nem-enzimatis összeteveői közé tartoznak a legfontosabb redox szabályozó molekulák, mint az aszkorbát és a glutation, ezen kívül tokoferolok, karotinoidok, fenolvegyületek. Ezek a molekulák képesek közvetlenül is kölcsönhatni szabadgyök molekulákkal, ezen kívül az enzimatis antioxiidánsok szubsztrátjai. Emellett fontos szerepük van egyéb sejtes folyamatokban, növekedésben, fejlődésben, szeneszencia során, valamint a sejtes redox állapot fenntartásában (De Pinto és De Gara, 2004; Foyer és Noctor, 2011; Sharma és mtsai., 2012).

Az aszkorbát a legnagyobb mennyiségben előforduló (~20 mM) kis molekulasúlyú antioxiidáns a növényekben. Az aszkorbát tartalom 90%-a redukált formában (ASC) van jelen kontroll körülmények között (Noctor és Foyer, 1998). Szubsztrátja az APX enzimnek, így a H_2O_2 lebontás fontos eleme, visszaredukálása az aszkorbát-glutation cikluson keresztül történik. Ezen kívül közvetlenül is képes kölcsönhatni 1O_2 -nel, $O_2^{\cdot-}$ -nal és $\cdot OH$ -kel, és detoxifikálni azokat. Képes redukálni a tokoferil gyököt, ami a lipidperoxidáció folyamatának terminálása

során tokoferolból jön létre, így a membránok védelmében is jelentős szerepe van (Noctor és Foyer, 1998).

A glutation egy tiol tartalmú tripeptid (γ -glutamil-ciszteinil-glicin), mely talán az egyik legjelentősebb kis molekulású antioxidáns vegyület. A kloroplasztisban és a citoszolban szintetizálódik kétlépéses folyamat során, majd minden sejtorganelumba eljut. Szubsztrátja az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek (Foyer és Halliwell, 1976), de ezen kívül a szerepe van detoxifikációs folyamatokban (Cummins és mtsai., 2011), fehérjék glutationilálásában (Noctor és mtsai., 2012), a nehézfémek elleni védekezésben, a fitokelatinok építőköve (Grill és mtsai., 1989), valamint redukált szerves kén raktár (Rennenberg, 2001). Olyan fontos folyamatokban is részt vesz, mint a sejtciklus szabályozása, programozott sejthalál, illetve fejlődés szabályozása (Vernoux és mtsai., 2000; Cairns és mtsai., 2006; Kranner és mtsai., 2006; Diaz-Vivancos, 2010a, b). Központi elem a sejt redox állapotának fenntartásában, alapállapotban az össz glutation 95%-a redukált formában (GSH) van jelen (Foyer és Noctor, 2005; Meyer, 2008; Mhamdi és mtsai., 2010; Noctor és mtsai., 2011).

2.5. Redox állapot, redox potenciál és detektálásuk növényekben

Az élő sejtben lejátszódó folyamatok közül nagyon sok oxidáló-redukáló reakció. A sejt, és egyes alkotóinak redox környezetét a bennük megtalálható molekulák redox állapotának összessége adja meg. Ez a redox állapot függ az egyes redox párok redox potenciáljától, a redox párok koncentrációjától, és a kompartmentum pH-jától is (Schafer és Buettner, 2001; Dietz, 2003). A legfontosabb meghatározó elemei a sejt redox állapotának a piridin nukleotidok (NADPH/NADP⁺; NADH/NAD⁺), a glutation (2GSH/GSSG), az aszkorbát (ASC/DHA), tioredoxinok (TRX_{red}/TRX_{ox}), tokoferolok, glutaredoxinok, peroxiredoxinok és tiol tartalmú fehérjék (Halliwell és Gutteridge, 2015; Dietz, 2003; Kocsy és mtsai., 2013). Ezek a rendszerek egymástól nem izoláltak, például a tioredoxin és glutation rendszer is NADPH-t használ redukáló komponensként, így termodinamikailag kapcsolódnak egymáshoz (Schafer és Buettner, 2001).

Mivel a sejt redukáló állapotának meghatározásához gyakorlatilag nem volna kivitelezhető az összes redox pár redox potenciálját megmérni, helyette inkább egy reprezentatív redox pár kiválasztásával lehet arra következtetni. Erre alkalmas a 2GSH/GSSG redox pár, mely kiemelkedő szereppel bír a redukáló pool biztosításában (Gilbert, 1990), redox potenciáljának (fél-cella redox potenciál, E_{hc}) változásai jól korrelálnak a sejt állapotával. Például osztódó sejtben $E_{hc} \approx -240$ mV, differenciálódó sejtben $E_{hc} \approx -200$ mV, apoptózis alatt $E_{hc} \approx -170$ mV

(Hutter és mtsai., 1997; Cai és Jones, 1998; Kirilin és mtsai., 1999; Schafer és Buettner, 2001). Ez az érték eltér a különböző szervezetekben, szövetekben, sejtekben és sejtalkotókban is (Szalai és mtsai., 2009). Az E_{hc} kiszámolható az alábbi egyenlet alapján:

$$E_{hc} = E_0 - \left(\frac{2,303 * R * T}{n * F} \right) * \log \left(\frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right)$$

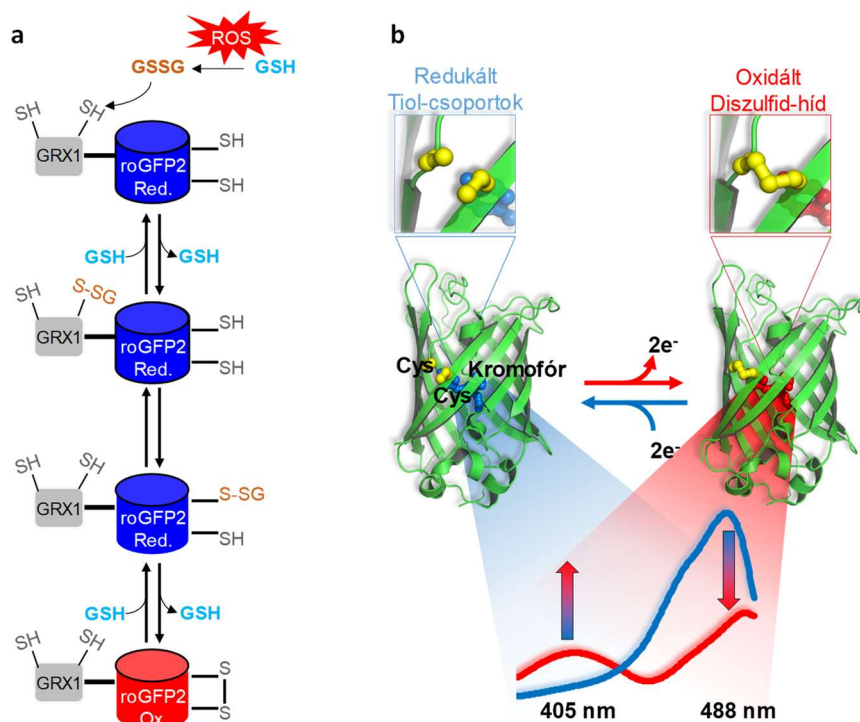
, ahol E_0 a glutation redox pár standard redukciós potenciálja 25°C-on, 7-es pH-n (-240 mV); 2,303 a korrekciós érték a Nernst egyenletből természetes alapú logaritmusból (ln) tízes alapú logaritmusba (log) való alakításához; R az egyetemes gázállandó (8,314 J*K⁻¹*mol⁻¹); T az abszolút hőmérséklet (298,15 K); F a Faraday állandó (96485 C*mol⁻¹); n pedig az átadott elektronok száma (2) (Schafer és Buettner, 2001). Ezek alapján tehát az E_{hc} számítása, ahol a GSH és GSSG koncentrációk mM-ban értendők:

$$E_{hc} = -240 \text{ mV} - \left(\frac{59,1 \text{ mV}}{2} \right) * \log \left(\frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right)$$

Ez a módszer alkalmas egy adott rendszerben *in vitro* meghatározott glutation tartalmakból redox potenciál meghatározására, viszont nem alkalmas *in vivo* redox potenciál változások megfigyelésére. Erre viszont kiváló redox szenzitív, zöld fluoreszcens protein alapú (roGFP) fluoreszcens próbákat fejlesztettek ki, melynél az alap GFP molekula hordó szerkezetébe, két szomszédos lefutású β -redőbe ciszteineket illesztettek a 147. és a 204. aminosav helyére (Hanson és mtsai., 2004). A ciszteinek között a molekula oxidáltságától függően diszulfid híd alakulhat ki, ami megváltoztatja a fehérje spektrális tulajdonságait (**2. ábra**). Ily módon, más egyéb aminosavakat is kicserélve 6 különböző roGFP variánst hoztak létre (roGFP1-6), melyek közül a roGFP1 (C48S/Q80R/S147C/Q204C) és roGFP2 (C48S/T65S/Q80R/S147C/Q204C) használata terjedt el (Hanson és mtsai., 2004). Mindegyik roGFP molekula kétszűcsos gerjesztési spektrumot mutat, az első csúcs 390 nm-nél, a második (nagyobb) csúcs 488 nm gerjesztésnél jelenik meg. A fluoreszcenciát 500-530 nm emissziós hullámhossznál detektálhatjuk. Oxidáció során megnő a fluoreszcencia intenzitás 390 nm gerjesztésnél, ezzel párhuzamosan lecsökken 488 nm gerjesztésnél. A roGFP1 és a roGFP2 gerjesztési spektruma különböző, roGFP2 esetén nagyobb a különbség az oxidált, illetve a redukált molekula fluoreszcencia intenzitásában 488 nm gerjesztési hullámhosszon, ezért pontosabb meghatározást tesz lehetővé.

A roGFP2 a GRX enzimen keresztül érzékeli a glutation pool redukáltságát egy többlépéses reakcióban, mely során a GRX oxidálódik GSSG-vel való reakciója során, majd ezt az oxidációt képes közvetíteni a roGFP2 molekula felé, ennek során a ciszteinek tiol-csoportjai oxidálódva diszulfid-hidat hoznak létre (Meyer és Dick, 2010; Morgan és Schwartzländer,

2016) (2. ábra). A próba hatékonyságának növeléséhez a roGFP2 fehérjét összekapcsolták humán GRX1 fehérjével egy 31 aminosavas összekötőn keresztül (Gutscher és mtsai., 2008).



2. ábra A GRX1-roGFP2 bioszenzor. **a)** A GRX1-roGFP2 glutationnal való reakciójának folyamatábrája (Meyer és Dick, 2010) **b)** Redukáltsági állapotól függő molekulán belüli konformációváltozások, melyek kihatnak a GRX1-roGFP2 gerjesztési spektrumára (Morgan és Schwartzländer, 2016).

A két gerjesztési hullámhossznál detektált fluoreszcencia intenzitásokból számíthatjuk ki a glutation függő redox potenciált az alábbi képlet alapján:

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

,ahol E_{roGFP}^0 a roGFP2 molekula középponti redox potenciálja, értéke -272 mV (pH 7, szobahőmérséklet), R az egyetemes gázállandó ($8,315 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T az abszolút hőmérséklet (298,15 K), z az átadott elektronok száma (2), F a Faraday állandó ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), OxD_{roGFP} pedig a próba oxidáltságának mértéke (Schwarzländer és mtsai., 2008).

2.6. A glutation peroxidázok

A glutation peroxidáz (GPX) enzimek első tagját Mills (1957) fedezte fel 60 évvel ezelőtt vörösvértestekben, és olyan antioxidáns enzimként jellemezte, mely képes H_2O_2 bontására GSH redukáló szubsztrát segítségével. Több organizmuson történő intenzív kutatásokat követően megállapították, hogy ezek olyan szeleno- vagy nem szelenocisztein tartalmú enzimek, melyek H_2O_2 és organikus hidroperoxidok redukcióját végzik glutation, vagy más

redukáló szubsztrát jelenlétében vízzé, vagy megfelelő alkoholokká (EC 1.11.1.9; EC 1.11.1.12; EC 1.11.1.15) (Maiorino és mtsai., 1995; Herbette és mtsai., 2002; Margis és mtsai., 2008).

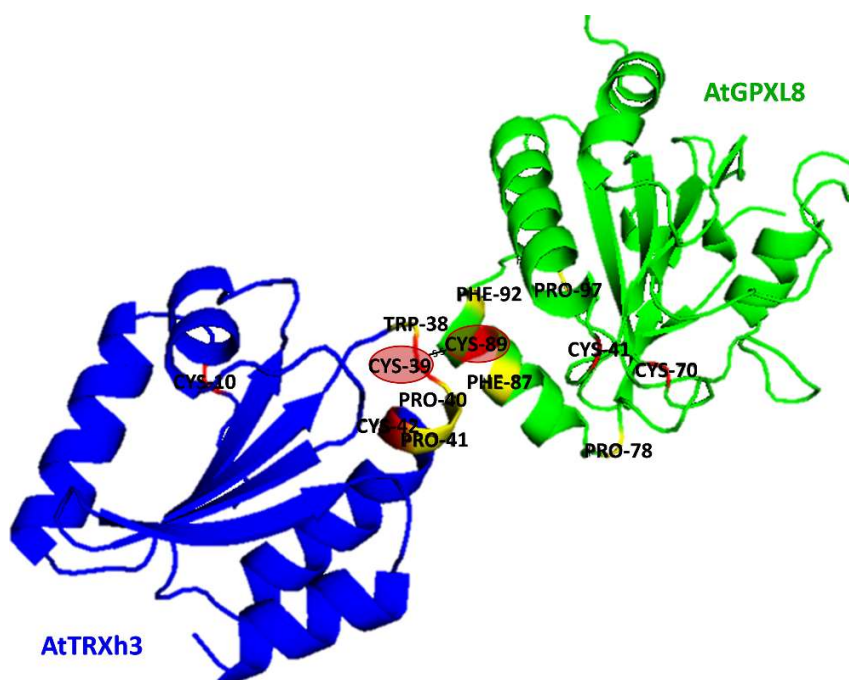
2.6.1. A glutation peroxidázok szerkezete

A GPX-ek konzervált struktúrával rendelkeznek, egy centrális β -hordó szerkezetet α -hélixek vesznek körbe. Különbségeket oligomerizációjukban figyelhetünk meg, néhány emlős GPX tetramer formában aktív, így extra oligomerizációs hurkok találhatók a 3. α -hélix és a 6. β -redő között (Toppo és mtsai., 2008). Nyárfában találtak dimerizálódó formát is, ez azonban nem rendelkezik ilyen extra hurokkal, a kapcsolódás aromás és hidrofób aminosavak kölcsönhatásán keresztül valósul meg (Koh és mtsai., 2007). Az enzim aktivitásának szempontjából nagy jelentősége van, hogy katalitikus helyükön ciszteint, vagy szelenociszteint tartalmaznak. Ha szelenocisztein tartalmú GPX-ben pontmutációval ciszteinre cserélték az aminosavat, a GPX aktivitás drasztikusan lecsökkent (Rocher és mtsai., 1992; Maiorino és mtsai., 1995). Mindez a funkciócsoportjaik tulajdonságain múlik, a cisztein tiol-csoportja fiziológiai pH-n csak részben található ionos formában, viszont a szelenocisztein szelenol csoportja fiziológiai pH-n mindig ionos. Ezek a funkciós csoportok csak ionos formában képesek kölcsön hatni H_2O_2 -dal vagy szerves hidroperoxidokkal, így befolyásolva az enzim aktivitását (Herbette és mtsai., 2007). Szelenocisztein esetén a hidroperoxid redukciója közben a szelenol anion oxidálódik szelénsavvá, majd GSH oxidációja által visszaalakul szelenollá (Ren és mtsai., 1997). Cisztein esetén a tiol-csoport hidroperoxid redukciója közben szulfonsavvá alakul. Ezt követően egy intramolekuláris (vagy intermolekuláris) átrendeződést követően két cisztein között egy diszulfid híd keletkezik, mely a kapcsolódó redukáló ágens (GSH, TRX_{red}) által visszaalakul tiol-csoporttá (Navrot és mtsai., 2006; Koh és mtsai., 2007).

2.6.2. A növényi glutation peroxidázok

A GPX szupercsalád tagjainak filogenetikai analizisét követően Margis és mtsai. (2008) megállapították, nem követnek lineáris evolúciót, eredetük bizonytalan. Aminosavszekvenciájuk elemzése alapján azonban feloszthatók három nagyobb csoportba: I) állatokban előforduló GPX-ek, II) gombákban, baktériumokban, cianobaktériumokban található GPX-ek, valamint III) növényi GPX-ek (Margis és mtsai., 2008). A növényi GPX-ek az elemzés szerint leginkább az állati foszfolipid hidroperoxid glutation peroxidázokhoz (PHGPX) állnak legközelebb, ezek az enzimek a lipidperoxidáció elleni antioxidáns védelem tagjai, szubsztrátjai a lipid hidroperoxidok (Toppo és mtsai., 2008; Tosatto és mtsai., 2008; Toppo és mtsai., 2009). Ezekről eltérően azonban az eddigi ismereteink szerint kivétel nélkül

ciszteint tartalmaznak katalitikus helyükön (Eshdat és mtsai., 1997), ráadásul nagyon sok növényi GPX a TRX_{red}-t részesíti előnyben redukáló komponensként a GSH-val szemben (Jung és mtsai., 2002; Iqbal és mtsai., 2006) (**3. ábra**), tehát inkább peroxiredoxinok, tioredoxin függő peroxidáz (TPOX) aktivitással rendelkeznek. A növényekben glutation függő peroxidáz aktivitása (GPOX) egyes GST-knek van. Éppen ezen tulajdonságaik miatt a GPX elnevezést javítva, inkább a glutation peroxidáz-szerű enzim (GPXL) kifejezés a helyesebb növények esetében (Attacha és mtsai., 2017; Bela és mtsai., 2018). A növényi GPXL-ek 3 ciszteint tartalmaznak a katalitikus helyükön, azonban ebből kettő vesz csak részt a hidroperoxid redukálása során: az úgynevezett peroxidatív cisztein, és a feloldó cisztein. A peroxidatív cisztein -SH csoportja reagál közvetlenül a peroxiddal, majd a feloldó cisztein – SH csoportjával diszulfid hidat képeznek. Ezt követően hasonló módon a feloldó cisztein és a TRX molekula egyik ciszteinje között jön létre diszulfid híd, végül a GPXL molekula regenerálódik. A harmadik cisztein szerepe még nem tisztázott, illetve valószínűleg szintén funkcionálhat feloldó ciszteinként, de ezt eddig csak kínai kelben bizonyították (Jung és mtsai., 2002).



3. ábra Arabisopsis GPXL8 és TRXh3 interakciójának és 3 dimenziós fehérje szerkezetének ábrázolása PyMOL szoftver segítségével (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) (Bela és mtsai., 2017a). A GPXL regeneráció során a TRXh3 39. cisztein aminosava diszulfid hidat képez a GPXL8 89. cisztein aminosavával, miközben egyéb jelölt aromás aminosavak segítik a fehérje-fehérje interakciót (Koh és mtsai., 2007).

Sok vizsgálat igazolta a növényekben található GPXL-ek szerepét különböző stresszválaszokban. Részei az antioxidáns védelmi rendszernek, fontos feladatuk a biológiai membránok védelme a lipid hidroperoxidok redukálása által (Herbette és mtsai., 2002; Jung és mtsai., 2002; Chen és mtsai., 2004a; Iqbal és mtsai., 2006; Navrot és mtsai., 2006). De nem

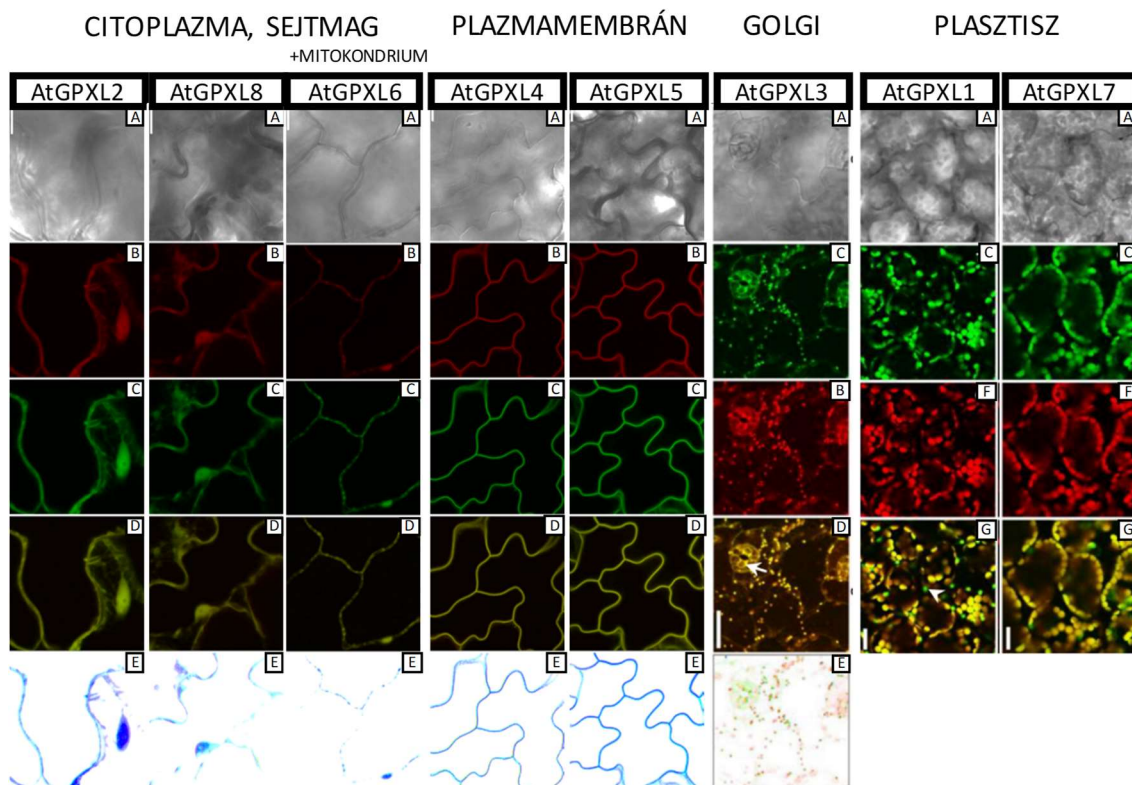
csak szerves hidroperoxidok lehetnek szubsztrátjaik, néhány tagjuk a fehérjék és DNS védelmében is szerepet játszhat oxidációs stressz alatt (Gaber és mtsai., 2012). H_2O_2 kezelésre a *GPXL* transzkript szintek megemelkedését tapasztalták *Panax ginseng*-ben (Kim és mtsai., 2014) és rizsben is (Li és mtsai., 2000; Passaia és mtsai., 2013). Oxidatív stresszt kiváltó paraquat kezelés hatására is *GPXL* gén aktivációját figyelték meg (Churin és mtsai., 1999), sőt, *Atgpxl8* inszerciós mutáns növény toleranciája rosszabb volt paraquat-tal szemben, mint a vad típusú növényé (Gaber és mtsai., 2012). De ezen kívül emelkedett *GPXL* transzkript szint volt jellemző biotikus stressz hatására (Criqui és mtsai., 1992; Roedel-Drevet és mtsai., 1998; Chang és mtsai., 2009; Kim és mtsai., 2014; Sytykiewicz és mtsai., 2016), sóstressz alatt (Sugimoto és Sakamoto, 1997; Avsian-Kretchmer és mtsai., 1999; Churin és mtsai., 1999; Milla és mtsai., 2003; Kang és mtsai., 2004; Gao és mtsai., 2014; Lima-Melo és mtsai., 2016), szárazság stresszben (Kang és mtsai., 2004; Islam és mtsai., 2015), szélsőséges hőmérséklet következtében (Milla és mtsai., 2003; Kang és mtsai., 2004; Passaia és mtsai., 2013; Diao és mtsai., 2014; Fu, 2014; Kim és mtsai., 2014; Islam és mtsai., 2015; Wang és mtsai., 2017), valamint mechanikai behatások és szennyeződések hatására (Churin és mtsai., 1999; Depége és mtsai., 2000; Agrawal és mtsai., 2002; Diao és mtsai., 2014). Nem csupán a *GPXL* transzkript szintek emelkedése utal a stresszválaszban betöltött fontos szerepükre (Bela és mtsai., 2017b), de azok az eredmények is, melyek bizonyították, hogy *gpxl* mutáns növények kevésbé toleránsak bizonyos stressz hatásokkal szemben (Miao és mtsai., 2006; Chang és mtsai., 2009; Gaber, 2011; Gaber és mtsai., 2012; Lima-Melo és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2017).

Azonban mivel a peroxidok átalakításában játszott jelentőségük alatta marad az állati GPX-ekhez, de még egyéb növényi antioxidáns enzimekhez, mint az APX-hez vagy a KAT-hoz képest is, feltételezhető más szerepük is (Eshdat és mtsai., 1997; Bela és mtsai., 2015; Passaia és Margis-Pinheiro, 2015; Bela és mtsai., 2017a). Valószínűleg részei a ROS indította jelátviteli folyamatoknak. Az aktív centrumban lévő cisteinek tiol-csoportjának oxidációja szulfonsasavvá szabályozó kapcsolóként működhet, hiszen gyorsan képes reagálni más tiol-csoportokkal intra- vagy intermolekuláris diszulfid-hidakat képezve (Ma és mtsai., 2007). Tehát a GPXL-ek olyan jelátvivők lehetnek, mely képesek peroxidok által kiváltott oxidációt továbbítani szabályozó fehérjék felé, melyek közvetlenül nem képesek a peroxidokkal való kölcsönhatásra, ily módon befolyásolva azok biológiai aktivitását, szabályozva különböző jelátviteli utakat (Luo és mtsai., 2005; Marinho és mtsai., 2014). Erre vonatkozóan jelenleg csak kevés bizonyíték áll rendelkezésünkre. Azonban Miao és mtsai. (2006) kimutatták, hogy

Arabidopsisban GPXL3 részt vesz az ABS jelátvitelben, képes kölcsönhatni 2C-típusú foszfatázokkal (ABSCISIC ACID INSENSITIVE-1, ABI1 és ABSCISIC ACID INSENSITIVE-2, ABI2), ily módon szabályozva a ROS-függő sztómaműködést. Ezen kívül a GPXL fehérjék hatással vannak fejlődési folyamatokra is, erre utalnak közvetetten a promóter régiókban található szabályozó elemek (Bela és mtsai., 2015) (**4. melléklet**). A rizs GPXL3-ról bebizonyosodott, hogy fontos szerepe van a hajtás és mag fejlődésében (Passaia és mtsai., 2013), gyökérnövekedésben és fotoszintézis folyamatában (Lima-Melo és mtsai., 2016). Arabidopsisban *gpxl7* mutáns növényen végzett kísérletek is azt igazolták, hogy a fehérje hatással van a hajtás és gyökér fejlődésére (Passaia és mtsai., 2014). Rizsben a *GPXL5* mutációja rontotta a magok csírázási rátáját, és negatív hatással volt a növény fejlődésére (Wang és mtsai., 2017).

2.6.3. Glutation peroxidáz-szerű enzimek lúdfüben

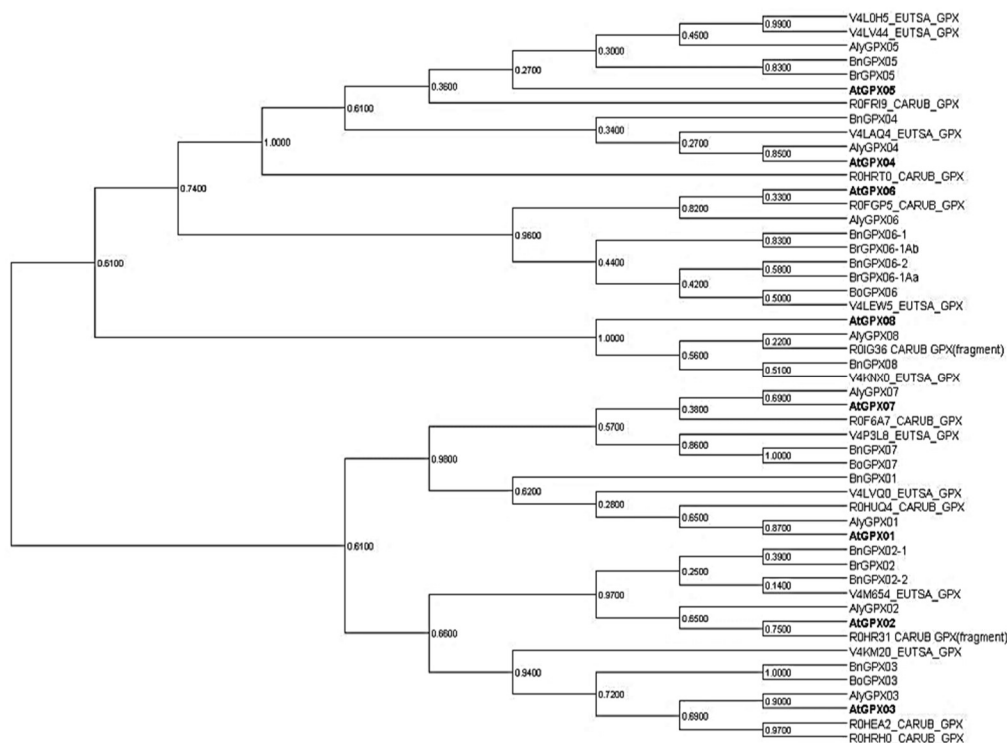
Arabidopsis thaliana-ban 8 GPXL-t azonosítottak, melyek különböző sejtorganellekben lokalizálódnak (Attacha és mtsai., 2017). Megtalálhatók a citoplazmában (GPXL2, GPXL6, GPXL8), a mitokondriumban (GPXL6), a sejtmagban (GPXL2, GPXL8), a plasztiszokban (GPXL1, GPXL7), a Golgi membránban (GPXL3), valamint a plazmamembránhoz kapcsolódva (GPXL4, GPXL5) (**4. ábra**).



4. ábra Arabidopsis thaliana GPXL fehérjék lokalizációja Attacha és mtsai. (2017) alapján, ahol az enzimeket roGFP2-vel fuzionálták. **A:** Fénymikroszkópos képek **B:** roGFP2 fluoreszcencia 405 nm gerjesztési hullámhossznál **C:** roGFP2 fluoreszcencia 488 nm gerjesztési hullámhossznál **D:** A és B összevont ábrázolása **E:** roGFP2 fluoreszcencia intenzitások

arányelemzésének ábrázolása (kékesebb színek redukált állapotot, pirosas színek oxidált állapotot jelölnek) **F**: Klorofill autofluoreszcencia **G**: C és F összevont ábrázolása.

A *Brassicaceae* család GPXL enzimeinek filogenetikai elemzését követően látható, hogy az *Arabidopsis* GPXL-ek kettesével találhatók meg egy-egy csoportban, de ez nem mindig van összhangban a lokalizációjukkal (5. ábra).



5. ábra *Brassicaceae* család kiválasztott fajaiban található GPXL-ek filogenetikai elemzése. Aly: *Arabidopsis lyrata*, At: *Arabidopsis thaliana*, Bn: *Brassica napus*, Bo: *Brassica oleracea*, Br: *Brassica rapa*, EUTSA: *Eutrema salsugineum*, CARUB: *Capsella rubella*; CARUB and EUTSA GPXL-ek annotációs számmal vannak feltüntetve a hivatalos elnevezés hiánya miatt, az *Arabidopsis thaliana*-ban található GPXL-ek vastagon vannak szedve az ábrán (Bela és mtsai., 2015).

Az AtGPXL1 és AtGPXL7 kloroplasztikus enzimek 82%-os egyezést mutatnak aminosavszekvenciájukban. Feltételezték átfedő funkciójukat is a nagy szekvencia hasonlóságból kiindulva (Milla és mtsai., 2003), azonban a két gén eltérő expressziós mintázatot mutatott (Chang és mtsai., 2009). Szerepük van a fotooxidatív stresszben és a növényi immunválaszban. Kimutatták, hogy kettős mutációjuk esetén megemelkedett a levelek H_2O_2 tartalma, ezáltal csökkent a növények fotooxidatív stressz toleranciája, de ezzel párhuzamosan nőtt a rezisztenciájuk virulens *Pseudomonas* baktériumokkal szemben. Ráadásul a levelek és a kloroplasztiszok morfológiája is megváltozott a mutáció hatására: a vad típushoz képest kerekesebb paliszád parenchima sejtekkel, megváltozott mezofillum sejtréteggel, és nagyobb légterekkel a sejtek között (Chang és mtsai., 2009). Igazolták azt is, hogy az AtGPXL7-nek fontos szerepe van a hajtás növekedésének szabályozásában (Passaia és mtsai., 2014).

Az AtGPXL2 egy kevésbé vizsgált izoenzim, mely megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban is. Xu és mtsai. (2010) igazolták, hogy ez az enzim része lehet egy citoszolikus antioxidáns enzimkomplexnek. Egy Arabidopsisban található állati PARK7 (Parkinson fehérje 7) homológ, az AtDJ1a egy olyan kapcsoló fehérje, mely képes összekapcsolni a SOD enzimet és az AtGPXL2-t, ezáltal a SOD működésével $O_2^{\cdot-}$ -ből előállított H_2O_2 -t a GPXL2 azonnal bontani képes vízzé (Xu és mtsai., 2010). Passaia és mtsai. (2014) meghatározták, hogy a 10-napos csíranövények gyökerében az *AtGPXL2*-nek a legmagasabb az expressziója a *GPXL* gének között, és hajtásban is jelentősen magas. Ezen csekély mennyiségű irodalmi adat alapján feltételezhető az AtGPXL2 fontos szerepe a stresszválaszban.

Az AtGPXL3 egy különleges monomer transzmembrán fehérje, mely a Golgi membránban található, enzimatikusan aktív részeivel a Golgi lumenben (Attacha és mtsai., 2017). *Atgpxl3* mutánsok vizsgálata során igazolták, hogy érzékenyebbek az oxidatív- és szárazság stresszre, valamint nagyobb a H_2O_2 tartalmuk, mint a vad típusú növényeknek (Miao és mtsai., 2006, 2007). Ők igazolták a GPXL3 kettős szerepét: az ABS jelátvitelben az ABI1 és ABI2 foszfatázokkal kölcsönhatva egyfajta kapcsolóként működhet, másrészt segít fenntartani a H_2O_2 homeosztázist enzimatis antioxiánsként (Miao és mtsai., 2006). Azonban ez a két eredmény ellentmondásos, hiszen ha ez az enzim a Golgi lumen felőli oldalán helyezkedik el, vajon hogyan képes kölcsön hatni *in vivo* az ABI1 és 2 foszfatázokkal? Ezt az ellentmondást erősíti az az eredmény is, mely szerint AtGPXL3-nak nincs szerepe az ABS függő gyökérmorfológia kialakulásában, *Atgpxl3* mutáns növények a vad típushoz hasonlóan viselkednek ABS kezelés hatására (Passaia és mtsa., 2014). Ez is jelzi, hogy még sok kérdés nem tisztázott a GPXL enzimekkel kapcsolatban még a modell növény lúdfűben sem.

Az AtGPXL4 és AtGPXL5 szintén membránkötött fehérjék, de ezeknek nincs transzmembrán doménjük. A plazmamembránhoz való kapcsolódásuk a citoplazma felőli oldalon mirisztoiláció segítségével történik (Attacha és mtsai., 2017). A mirisztoiláció irreverzibilis kotranszlációs módosítás, mely során a mirisztinsav az N-terminális glicinhez kapcsolódik kovalens módon (Wilcox és mtsai., 1987), majd ez képes horgonyozni a lipofil membránban. Ezekről az enzimekről sem áll rendelkezésre sok irodalmi adat, azonban rekombináns fehérjeként képesek a H_2O_2 és szerves hidroperoxidok redukálására (Iqbal és mtsai., 2006). Az *AtGPXL4* expressziója alig volt kimutatható hajtásban vagy gyökérben, szintje a legalacsonyabb a *GPXL*-ek között (Passaia és mtsai., 2014).

Az ATGPXL6-nak feltételezhetően kettős lokalizációja van, megtalálható a mitokondriumban is és a citoplazmában is. Szekvenciájában kettő start kodon figyelhető meg, egyik a

mitokondriális target szignál szekvenciája előtt, a másik pedig közvetlenül utána. A lokalizációs kísérleteink során is mindkettő sejten belüli térben egyenlő mértékben fordult elő (Attacha és mtsai., 2017). Sugimoto és Sakamoto (1997) igazolták az *AtGPXL6* emelkedett expresszióját só- és ozmotikus stressz alatt, valamint alumínium és vas kezelések hatására is. Egyéb kísérletek során is kiderült, hogy az *AtGPXL6* a legtöbb abiotikus stressz hatására aktiválódik (Milla és mtsai., 2003).

Az *AtGPXL8* sejtmagi és citoszolikus lokalizációját már Gaber és mtsai. (2012) igazolták, Attacha és mtsai. (2017) pedig megerősítették. Az *AtGPXL8*-nak fontos szerepe van az oxidációs stressz elleni küzdelemben mind a citoplazmában, mind pedig a sejtmagban a nukleinsavak védelme révén (Gaber és mtsai., 2012).

3. Célkitűzés

A glutation peroxidázokat már közel 60 éve vizsgálják állatokban, növényekben viszont számos kérdés megválaszolatlan még, hiszen nagyon sok eltérés van a két csoport között. Több *AtGPXL* gén is aktiválódhat abiotikus stressz hatására, vagy hormon kezelésre (Milla és mtsai., 2003). A promóter régiók *in silico* vizsgálatát követően több cisz-szabályozó elem is megtalálható esetükben, melyek abiotikus- vagy biotikus stresszválaszhoz kötődnek, vagy valamely hormonhoz kapcsoltak (Milla és mtsai., 2003; Bela és mtsai., 2015). Mindezek ellenére a növényi glutation peroxidázok (GPXL-ek) szerepe a stressz válaszban, jelátviteli folyamatokban, vagy a fejlődés szabályozásában még nem teljesen tisztázott. Munkánk során az *Arabidopsis*-ban található 8 GPXL vizsgálatát tűztük ki célul.

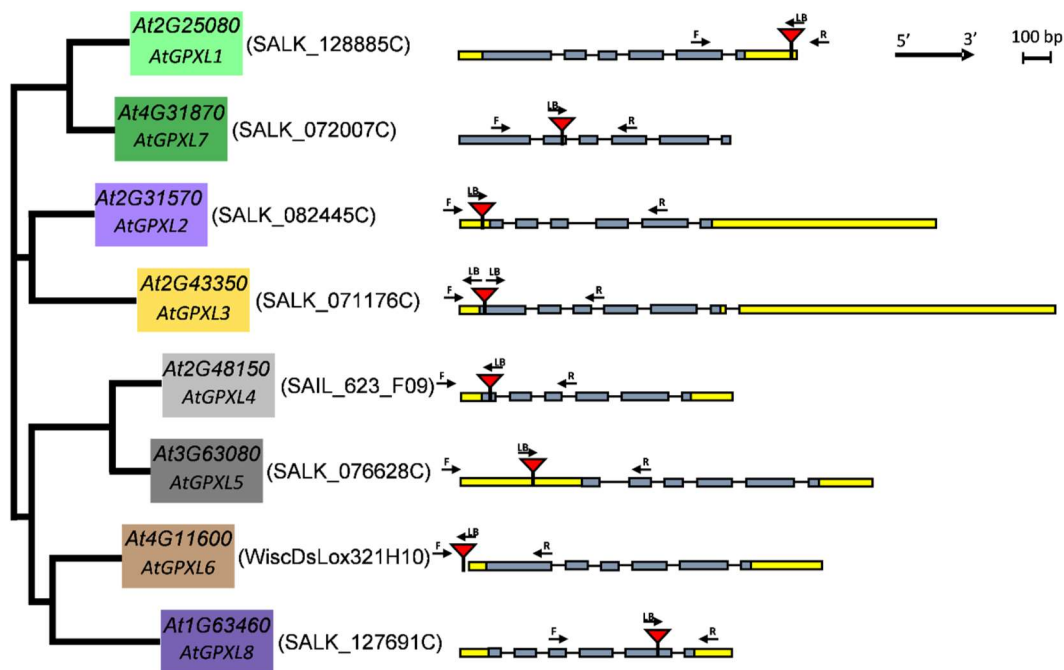
A dolgozatban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Milyen redukáló ágenst és szubsztrátot részesítenek előnyben az egyes *AtGPXL* enzimek?
- 2) Milyen élettani folyamatok változnak meg az *Arabidopsis* növények hajtásában és gyökerében egy-egy *AtGPXL* hiányában, vagy csökkent transzkript szint hatására kontroll körülmények között?
- 3) Mi lehet az *AtGPXL*-ek szerepe a stresszválaszban? Milyen változásokat figyelhetünk meg a vad típusú és *Atgpxl* mutáns növények élettani folyamataiban abiotikus stressz hatás alatt?
- 4) Hogyan változik a 8 *AtGPXL* transzkript szintje a hajtásban és gyökérben ozmotikus stressz hatására?
- 5) Lehet-e szerepük az *AtGPXL*-eknek a növények növekedésében és fejlődésében? Hogyan befolyásolhatják a redox állapotot? Részt vehetnek-e jelátviteli folyamatokban?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált növényi anyag

Lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh, Columbia ökotípus) vad típusú (Col-0) és a glutation peroxidáz szerű (*AtGPXL*) génekben T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns növényeket (*Atgpxl1-8*) használtunk a kísérletek egy részénél. A mutáns vonalakat a Nottinghami Arabidopsis Magellató Központból (NASC) szereztük be (*Atgpxl1* [AT2G25080]: SALK_128885C; *Atgpxl2* [AT2G31570]: SALK_082445C; *Atgpxl3* [AT2G43350]: SALK_071176C; *Atgpxl4* [AT2G48150]: SAIL_623_F09; *Atgpxl5* [AT3G63080]: SALK_076628C; *Atgpxl6* [AT4G11600]: WiscDsLox321H10; *Atgpxl7* [AT4G31870]: SALK_072007C; *Atgpxl8* [AT1G63460]: SALK_127691C), és az ellenőrzött homozigóta növényeket használtuk a kísérletek során. Az inszerciók helye a génekben, valamint az ellenőrzéshez tervezett primerek helyzete az **6. ábra** látható.



6. ábra Az *Arabidopsis glutation peroxidáz-szerű (AtGPXL)* gének rokonsági kapcsolatai és az inszerciók helye (piros háromszög), valamint az ellenőrzéshez tervezett oligonukleotidok helyzete (nyilakkal jelölve) a kísérleteink során használt *Atgpxl* mutáns növények esetén.

Az *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns gyökerek redox potenciáljának meghatározásához a növényeket redox érzékeny zöld fluoreszcens fehérjével (roGFP2-vel) transzformált, majd stabil konstrukciót tartalmazó Col-0 növényekkel kereszteztük. F3-as nemzedéktől a roGFP2 jelenlétét kanamicin szelekcióval és konfokális mikroszkóppal, a mutációk homozigóta voltát

pedig polimeráz láncreakció (PCR) segítségével ellenőriztük. A mutációkra homozigóta, és a roGFP2-t stabilan kifejező F4 nemzedéket használtuk a kísérletek során.

4.2. Növénynevelési körülmények

4.2.1. Hidropónikus kultúrában nevelt növények

A magokat 5 percig tartó 70%-os etanolos kezeléssel sterilizáltuk, majd 3 steril vizes mosást követően egy éjszakán keresztül 4 °C-on tartottuk, végül vágott végű Eppendorf csövekbe öntött agarkockára helyeztük őket. A növények 1 literes edényekben Hoagland tápoldatban nőttek, aminek az összetétele: 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 1 μM Fe-EDTA, 0,0475 μM H_2BO_3 , 14,48 μM MnCl_2 , 0,8148 μM ZnCl_2 , 0,3731 μM CuCl_2 , 0,001213 μM Na_2MoO_4 , (pH 5,8). 6 héten keresztül kontroll körülmények között neveltük a növényeket, a tápoldat cseréje hetente történt (7. ábra). A nevelés kontrollált körülményeit rövidnappal beállításkor növénynevelő kamra segítségével biztosítottuk (Fitoclima S 600 PLH, Aralab, Portugal), ahol 21°C-os állandó hőmérsékleten, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, 10 h/14 h fény/sötét periódusban és 70% relatív páratartalom mellett növekedtek a növények a kísérlet teljes ideje alatt.

Hosszúnappal beállításkor a növényeket üvegházi körülmények között neveltük 22°C-os hőmérsékleten, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, 12 h/12 h fény/sötét periódusban és 50-60% relatív páratartalom mellett. A kezelés a hatodik hetet követően 2 napig történt, ahol a Hoagland tápoldatot kiegészítettük 100 mM NaCl-dal, vagy 100/200 mOsm polietilén glikollal (PEG 6000; -0.489 MPa (Michel és Kaufmann, 1973)), illetve 5/10 μM H_2O_2 -dal.



7. ábra Hidropónikus kultúrában nevelt *Arabidopsis thaliana* növények

4.2.2. Talajban nevelt növények

A magokat közvetlenül föld:perlit 10:1 arányú keverékére szórtuk ki, majd a 2 hetes csíranövényeket szétültettük cserepekbe (8. ábra). A növényeket üvegházi körülmények között neveltük 10 hetes korukig 22°C-os hőmérsékleten, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, 12 h/12 h fény/sötét periódusban és 50-60% relatív páratartalom mellett. Ezt követően a növények egy részét hűtőkamrába (12°C), másik részét nevelőszekrénybe (32°C) helyeztük chilling, illetve magas hőmérsékleti stressz alkalmazásához két napig. Szárazságstressz esetén a cserepek tömegét folyamatosan mérve az előzetes kísérletek alapján számított 20%-os talajvízkapacitásig szárítottuk a talajt.



8. ábra Talajban nevelt *Arabidopsis thaliana* növények.

4.2.3. Táptalajon nevelt növények

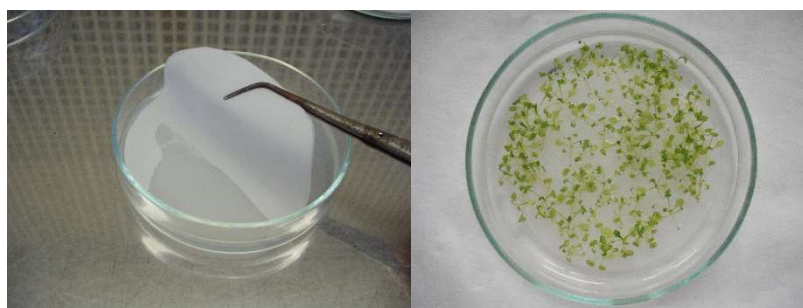
Táptalajon nevelt csíranövényeken használt kísérleteknél a fentebb leírtak szerint sterilizáltuk a magokat, 4 °C-on tartottuk egy éjszakán keresztül, majd ½ MS (Murashige Skoog) táptalajra helyeztük. A táptalaj összetétele ½ mennyiségű MS só, kiegészítve Gamborg B5 vitaminokkal, 0,5% szacharóz és 0,8% agar (pH 5,7).

Gyökérnövekedés meghatározásánál a csíranövényeket 4 napos korukban az indító ½ MS táptalajról áthelyeztük steril csipesszel 120x120 mm-es szögletes Petri csészékbe, szintén ½ MS táptalajra, melyek egy része ki lett egészítve 50/100 mM NaCl-dal vagy 100/200 mM mannitollal. PEG kezeléshez a táptalajt előzetesen 100/200 mOsm steril PEG oldattal inkubáltuk 24 órán át (mivel a PEG akadályozza a táptalaj szilárdulását). Az áthelyezést követően 14 napig detektáltuk a gyökerek növekedését, majd meghatároztuk egyéb fiziológiai paraméterüket (9. ábra).



9. ábra *Arabidopsis thaliana* növények nevelése gyökernövekedés meghatározásához

Másik kísérleti rendszerben mielőtt a steril magokat a táptalajra vetettük volna, egy steril hálót terítettünk annak felszínére (10. ábra). Ez nem akadályozta a tápanyagok felszívódását, a csíranövények szépen fejlődtek rajta 2 hétig, majd a háló segítségével a kezeléseket tartalmazó táptalajra könnyedén át tudtuk őket helyezni. Kezeléshez az alap $\frac{1}{2}$ MS táptalajt kiegészítettük 50/100 mM NaCl-dal, vagy 100/200 mM mannitollal. PEG kezeléshez a táptalajt előzetesen szintén 100/200 mOsm steril PEG oldattal inkubáltuk 24 órán át. 2 nap kezelést követően határoztuk meg a csíranövények egyes fiziológiai paramétereit.

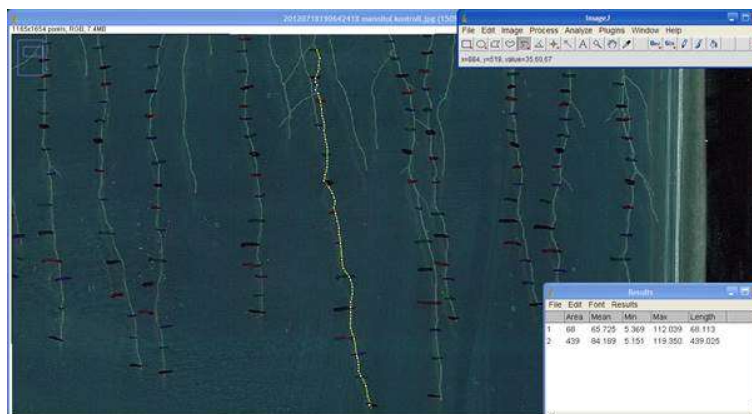


10. ábra *Arabidopsis thaliana* növények nevelése táptalajon hálóval.

A gyökerek redox potenciáljának meghatározásához a roGFP2 szenzor fehérjét termelő növények magjait sterilizálást követően közvetlenül kontroll $\frac{1}{2}$ MS, vagy 150 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajra vetettük, és 5 nap után vizsgáltuk a csíranövényeket pásztázó lézer konfokális mikroszkóp (CLSM) segítségével.

4.3. Növekedési paraméterek meghatározása

A 4 napos előnevelt csíranövényeket kontroll, illetve ozmotikumot tartalmazó Petri csészékbe helyeztük, majd a gyökerek növekedését két héten keresztül naponta detektáltuk, jelöltük. Ezt követően szkennel segítségével rögzített képeken ImageJ program (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (11. ábra) segítségével mértük meg a gyökerek hosszát, melyet a pixelek számából határoztunk meg ugyanolyan körülmények között szkennelt vonalzó segítségével.



11. ábra Az ImageJ program felhasználói felülete a gyökök hosszának meghatározása közben.

Ezt követően lemértük a csíranövények tömegét, majd 24 óra szárítószekrényben (50°C) való szárítás után a szárított tömegét. Az adatokból aktuális víztartalmat határoztunk meg az alábbi képlet szerint: $\text{aktuális víztartalom (\%)} = \frac{(\text{friss tömeg} - \text{szárított tömeg})}{\text{szárított tömeg}} * 100\%$

4.4. Életképesség meghatározása és reaktív oxigénformák detektálása fluoreszcens mikroszkóppal

A 4+14 napos csíranövény gyökök és hajtások életképességének meghatározására fluorescein diacetát (FDA) festéket alkalmaztunk (Molnár és mtsai., 2018). Az FDA egy membrán permeabilis apoláris fluorofór, amit a sejten belüli aktív észterázok alakítanak fluoreszkáló poláris fluorescein formává azáltal, hogy lehasítják az acetát csoportot. Csak azok a sejtek mutatnak fluoreszcenciát, melyekben az észterázok jól működnek, a membránok épek, vagyis az FDA az élő sejteket festi meg. A csíranövényeket sötétben tartva 20°C-on, 2 ml 10 µM festékkoldatban inkubáltuk 30 percen keresztül, majd 20 perc alatt 4-szer mostuk 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav/kálium klorid (MES/KCl, 10 mM/50 mM, pH 6,15) pufferrel (Molnár és mtsai., 2018). Az így megfestett mintákat tárgylemezre helyeztük, és nagyfelbontású digitális kamerával felszerelt (Axiocam HR) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axiovert 200 M, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A mikroszkóp 10-es szűrőjét használtuk a méréshez (gerjesztési hullámhossz: 450-490 nm, detektált hullámhossz: 515-565 nm). A pixel intenzitásokat a gyökérben 100 µm-rel a gyökércsúctól 60 µm átmérőjű körökben, a hajtásokban pedig 3x200 µm átmérőjű körökben határoztuk meg.

A csíranövény gyökök és hajtások össz ROS szintjének detektálásához 2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA) festéket alkalmaztunk (Pető és mtsai., 2013). Hasonló elven működik, mint az FDA, az apoláros molekula a sejtbe jutva észterázok hasítása által alakul poláros formává, viszont ebben az esetben a molekulának oxidálódnia is kell, hogy

fluoreszcens jelet adjon. Ez az oxidáció nem specifikusan, bármely ROS által bekövetkezhet, így alkalmas a festék össz ROS szint meghatározáshoz. A csíranövényeket 15 percig inkubáltuk sötétben 37°C-on 10 μ M H₂DCFDA oldattal. A festés után 20 percen át 4-szer mostuk a mintákat MES/KCl pufferrel (10 mM/50 mM, pH 6,15) (Pető és mtsai., 2013). A minták mikroszkópos vizsgálata, valamint a pixelintenzitás mérések hajtásban és gyökerekben az életképesség meghatározásnál leírtak szerint történtek.

Szuperoxid gyökanion mennyiség vizualizálásához dihidroetídium (DHE) festéket használtunk (Lehotai és mtsai., 2011). A festék alap állapotban kék fluoreszcenciával bír, azonban szuperoxid gyökkel reagálva oxietídium keletkezik, amely már vörös fluoreszcens jelet ad, ráadásul képes nukleinsavakkal interkalációra, tehát beékelődhet a DNS kettős hélix belső részében elhelyezkedő bázisok közé. A csíranövényeket 30 percig inkubáltuk sötétben, 37°C-on 10 μ M DHE oldattal, majd 20 perces mosást követően 10 mM trisz-hidroximetil-amino-metán (Tris-HCl) (pH 7,4) pufferrel, és tárgylemezre helyeztük őket. A gyökereket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axiovert 200 M, Carl Zeiss, Jéna, Németország) a mikroszkóp 9-es szűrőjét használva (gerjesztési hullámhossz: 450-490 nm, detektált hullámhossz: 515- ∞ nm). A pixel intenzitásokat a gyökerekben 100 μ m-rel a gyökércsúcstól 60 μ m átmérőjű körökben állapítottuk meg.

4.5. Hidrogénperoxid tartalom meghatározása

A H₂O₂ tartalmakat spektrofotometriásan állapítottuk meg Velikova és mtsai. (2000) módszere alapján. A körülbelül 200 mg növényi anyagot 750 μ l 0,1% triklórecetsavban (TCA) homogenizáltuk, majd centrifugálás után (15 perc, 12000 g, 4°C) kémcsőbe mértünk 0,25 ml felülúszót, hozzáadtunk 0,25 ml foszfát puffert (10 mM, pH 7,0) és 0,5 ml 1 M kálium-jodid oldatot. A reakciótermék mérését 10 perc sötétben való inkubálást követően 390 nm-en végeztük foszfát pufferrel szemben (Uvikon 930 spektrofotométer, Kontron AG, Eching, Germany). A H₂O₂ tartalmakat, 0,1-5 mM H₂O₂ koncentrációssal készített kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

4.6. Lipidperoxidáció mértékének detektálása

A lipidperoxidáció mértékének megállapításához a folyamat egyik végtermékének, a malondialdehydnek (MDA) mennyiségét határoztuk meg, tiobarbitursavval való reakciójuk alapján (Ederli és mtsai., 1997). Benyó és mtsai. (2016) által módosított módszert használva

50 mg növényi anyagot először folyékony nitrogénben porítottunk, 0,5 ml 0,1% TCA-val homogenizáltuk, majd a további lipidperoxidáció megakadályozására 50 µl 4% butilált hidroxitoluolt (BHT) adtunk hozzá, és centrifugáltuk (20 perc, 12000 g, 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, Germany). Az MDA koncentrációt $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficienssel (ϵ) számoltuk.

4.7. Antioxidáns enzimek aktivitásának meghatározása

Az antioxidáns enzimek aktivitásának meghatározásához körülbelül 250 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 (20 perc, 12000 g, 4°C). A felülúszót használtuk tovább enzimaktivitások mérésére, melynek fehérjetartalmát Bradford (1976) módszere alapján állapítottuk meg. Az enzimaktivitások meghatározása minden esetben spektrofotometriás módszerrel történt az Uvikon 930 műszer használatával (Kontron AG, Eching, Germany).

4.7.1. Tioredoxin peroxidáz

A tioredoxin peroxidáz (TPOX; EC 1.11.1.15) aktivitás meghatározásához Horváth és mtsai. (2015a) által alkalmazott módszert vettük alapul, néhány módosítással. Szubsztrátként kumén hidroperoxidot (CHP) használtunk. A reakcióelegy tartalmazott 0,2 mM NADPH-t, 5 µM rekombináns *Arabidopsis* tioredoxin h3-t (TRXh3), 0,1 µM rekombináns *Arabidopsis* NADPH függő tioredoxin reduktáz a-t (NTRa), 50 µl enzim kivonatot és 0,25 mM szubsztrátot 100 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) 1 ml mérési térfogatban. A rekombináns fehérjék *E. coli* BL21 baktériumokban lettek termeltetve Marty és mtsai. (2009) módszere alapján. A NADPH fogyást 340 nm-en detektáltuk, és minden esetben korrigáltuk az értékeket szubsztrátot nem tartalmazó reakcióelegy mérésével, hogy kiküszöböljük a nem specifikus NADPH fogyást. 1 U az az aktivitás, ami 1 perc alatt 1 nmól NADPH oxidációjára képes, $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.2. Glutation peroxidáz

A glutation peroxidáz (GPOX; EC 1.11.1.9) aktivitást szintén Horváth és mtsai. (2015a) által használt módszer alapján mértünk. A reakcióelegy tartalmazott 4 mM GSH-t, 0,2 mM NADPH-t, 0,05 U GR enzimet (Sigma-Aldrich, Baker's yeast), 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 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, $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.3. Glutation transzferáz

A glutation transzferáz aktivitást (GST; EC 2.5.1.18) egy mesterséges szubsztrát, az 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) segítségével határoztuk meg, korábban leírt módszert használva (Horváth és mtsai., 2015a). A reakcióelegy tartalmazott 1 mM GSH-t, 100 μl enzim kivonatot és 1 mM CDBN szubsztrátot 100 mM foszfát pufferben (pH 6,5) 1 ml végtérfogatban. 340 nm-en mértük a CDBN-GS konjugátumok képződését. 1 U-nak határoztuk meg azt az aktivitást, amely 1 perc alatt 1 nmól konjugátum előállítására képes, $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.4. Gvajakol peroxidáz

A gvajakol peroxidáz (POX; EC 1.11.1.7) aktivitást a 470 nm-en mértük gvajakol szubsztrát oxidációjával keletkező tetragvajakol keletkezésének detektálásával (Horváth és mtsai., 2015b). A reakcióelegy tartalmazott 30 mM H_2O_2 -t, 10 μl enzim kivonatot és 20 mM gvajakolt 50 mM foszfát pufferben (pH 7,0) 1,5 ml végtérfogatban. Azt az enzimaktivitást, amely 1 perc alatt 1 μmol tetragvajakol képződését katalizálta, 1 U-nak határoztuk meg, $\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.5. Aszkorbát peroxidáz

Az aszkorbát peroxidáz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitást Tari és mtsai. (2015) módszere alapján határoztuk meg. Ebben az esetben az extrakciós puffer 1 mM hozzáadott ASC-ot is tartalmazott. A mérés során 290 nm-en detektáltuk az ASC H_2O_2 -függő oxidációját. A reakcióelegy tartalmazott 1 mM H_2O_2 -t, 100 μl enzim kivonatot és 50 μM ASC-ot 50 mM foszfát pufferben (pH 7,0) 1 ml végtérfogatban. 1 U volt az enzimaktivitás, ha 1 perc alatt az enzim 1 nmól ASC-ot oxidált, $\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.6. Kataláz

A kataláz (KAT; EC 1.11.1.6) aktivitását H_2O_2 H_2O -vá való bontásával határoztuk meg, 240 nm-en detektálva (Horváth és mtsai., 2015b). A reakcióelegy tartalmazott 100 μl enzim kivonatot és 20 mM H_2O_2 -t 50 mM foszfát pufferben (pH 7,0) 1,5 ml végtérfogatban. 1 U volt az enzim aktivitása, ha 1 perc alatt 1 μmol H_2O_2 -t bontott el, $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.8. Nem-enzimatis antioxiidáns tartalom meghatározása

Az aszkorbát és glutation tartalmakat Horváth és mtsai. (2015a) által használt módszer alapján határoztuk meg. Körülbelül 300 mg növényi anyagot 1,2 ml 5% TCA-ban homogenizáltunk, majd centrifugálást (20 perc, 12000 g, 4°C) követően a felülúszót használtuk a mérésekhez. Savas közegben a glutation diszulfid (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 használtuk (Kontron AG, Eching, Germany).

4.8.1. Aszkorbát tartalom

Az aszkorbát tartalmakat Law és mtsai. (1983) módszere alapján határoztuk meg. Mivel a módszer a redukált aszkorbát tartalom detektálására alkalmas, így az össz aszkorbát tartalom méréséhez a felülúszó 100 µl-ét 100 µl 10 mM ditiotreitol hozzáadásával (DTT) redukáltuk 10 percig, majd 100 µl 0,5% N-etilmaleimid (NEM) hozzáadásával inaktiváltuk a DTT-t, alkilálva annak tiolcsoportját. Redukált aszkorbát (ASC) meghatározásához közvetlenül a kezeletlen felülúszót hígítás után használtuk. A továbbiakban a mintákat ugyanúgy kezeltük, hozzáadva 500 µl 10% TCA-t, 400 µl 43% foszforsavat (H_3PO_4), 400 µl 4% 2,2'-bipiridilt, valamint 200 µl 3% vas(III)-kloridot ($FeCl_3$). 1 órán keresztül 37°C-on történt inkubációt követően a minták optikai denzitását 525 nm-en detektáltuk növényi kivonatot nem tartalmazó reakcióeleggyel szemben. A mennyiségeket 0,1-10 mM ASC koncentrációssal készített kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

4.8.2. Glutation tartalom

A glutation tartalmak meghatározásához egy, a GR enzim használatán alapuló spektrofotométerias 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). 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 (Sigma-Aldrich, Baker's yeast) foszfát pufferben (0.1 M, pH 7.5) 1 ml végtérfogóban. 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.

4.9. Glutation függő redox potenciál meghatározása

A glutation függő redox potenciált két módszerrel határoztuk meg méréseink során. Kiszámolható a GSH/GSSG mennyiségek ismeretében, melyeket fotometriásan határoztunk meg. Ez az úgynevezett félcella redox potenciál (E_{hc}), melyet Schafer és Buettner (2001) által közölt egyenletet használva számítottunk ki, ahol -240 mV a glutation redox pár standard redox potenciálja 25°C-on és pH 7,0-n:

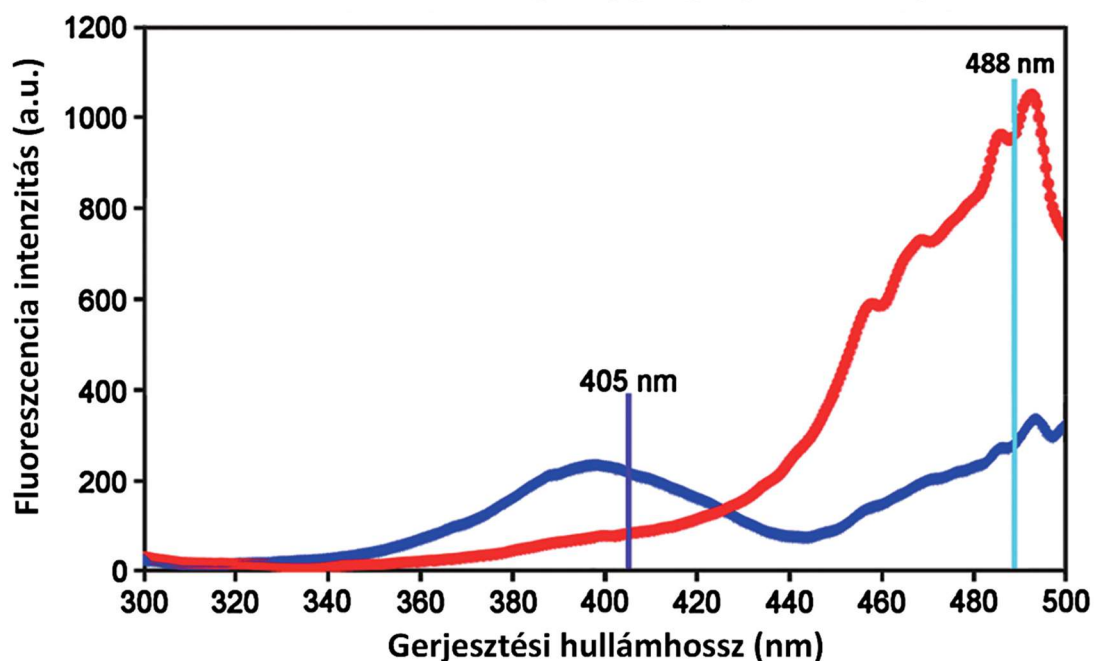
$$E_{hc} = -240 - \left(\frac{59,1}{2}\right) * \log\left(\frac{[GSH]^2}{[GSSG]}\right)$$

A másik lehetőség a redox szenzor zöld fluoreszcens fehérje (roGFP2) használatával lehetséges. Ebben az esetben a roGFP2-t kifejező növényeket Olympus Fluoview FV1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (CLSM; Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Németország) (12. ábra).



12. ábra Redox potenciál meghatározásának sematikus menete redox szenzitív zöld fluoreszcens fehérje (roGFP2) használatával Schwarzländer és mtsai. (2008) alapján.

A roGFP2 redukáltság függő gerjesztési spektruma



13. ábra A redox szenzitív zöld fluoreszcens fehérje (roGFP2) gerjesztési spektrumai különböző redukáltsági állapotban. A kék vonal a maximum oxidált állapotban, a piros vonal pedig a maximum redukált állapotban felvett gerjesztési spektrumot jelöli. A fluoreszcencia intenzitásokat 500-530 nm közötti emissziós hullámhosszon detektálták (Meyer és Dick, 2010)

A mintákat két hullámhosszon gerjesztettük (405 nm és 488 nm), majd az emittált fluoreszcenciát 500-530 nm között detektáltuk (**13. ábra**). A két hullámhossznál gerjesztett fluoreszcencia intenzitások alapján számoltuk ki a glutation függő redox potenciált. Először ehhez meg kell határozni a szenzor oxidáltságának mértékét (OxD_{roGFP2}):

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

, ahol R a mintán mért két hullámhosszon gerjesztett intenzitás értékek aránya (I_{405}/I_{488}), R_{red} a 10 mM ditioneitolal (DTT) maximálisan redukált mintán mért arány (I_{405red}/I_{488red}), R_{ox} az 5 mM AldritiolTM-4-gyel (DPS) maximálisan oxidált mintán mért arány (I_{405ox}/I_{488ox}). Ezt követően az alábbi egyenletből számítható glutation függő redox potenciál (E_{GSH}):

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

, ahol E_{roGFP}^0 a roGFP2 molekula középponti redox potenciálja, értéke -272 mV (pH 7, szobahőmérséklet), R az egyetemes gázállandó ($8,315 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T az abszolút hőmérséklet (298,15 K), z az átadott elektronok száma (2), F pedig a Faraday állandó ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) (Schwarzländer és mtsai., 2008).

4.10. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció segítségével (RT-qPCR)

Az *Arabidopsis thaliana* GPXL gének, valamint kiválasztott, stresszválaszban fontos szerepet játszó gének expresszióját valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével határoztuk meg RNS kivonást követően, mely Benyó és mtsai. (2016) által leírt LiCl alapú módszert követve történt. Az izolált RNS minták koncentrációját fotometriás módszerrel határoztuk meg (NanoDrop; Eppendorf). Összesen 1 µg RNS-ből 20 µl végtérfogatban reverz transzkriptázzal (Thermo Scientific), random hexamer primerek felhasználásával szintetizáltunk cDNS-t. A cDNS-szintézis tisztaságának ellenőrzése céljából reverz transzkriptáz nélküli kontroll reakciókat is összeállítottunk, majd PCR segítségével ellenőriztük a minták tisztaságát. Az RT-qPCR reakcióhoz hígított cDNS-t használtunk templátként, Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, high ROX reakcióelegyet, és primereket a gyártó utasításait követve 10 µl végtérfogatban. A detektálás az ABI Prism 7900-HT Fast Real-Time (Applied Biosystem, California, USA) készülékkel történt. A kísérletben használt primerek a mellékletben megtalálhatók (**3. melléklet**). Minden egyes RT-qPCR mérést egy disszociációs görbe analízis is követett, mely minden esetben egy-egy termék

meglétét igazolta egycsúcsos keskeny kiemelkedés alapján. Kísérleteinkben az *aktin2* (*At3g18780*) gén expressziója bizonyult konstansnak minden mintánál, így ezt használtuk belső kontrollnak a normalizáláshoz (Papdi és mtsai., 2008). Az RT-qPCR mérés során kapott adatokat a továbbiakban $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ módszer segítségével számítottuk tovább (Livak és Schmittgen, 2001), majd, hogy jobban átláthatóak legyenek az expressziós különbségek, log₂ skála szerint mindig az *Arabidopsis thaliana* Col-0 kontroll hajtás, vagy gyökér mintából származó értékeket vettük 0-nak, és hőtésképen ábrázoltuk az adatokat. A piros árnyalatok repressziót, a zöld árnyalatok aktiválódást jeleznek.

4.11. Az AtGPXL fehérjék biokémiai jellemzése

4.11.1. Konstrukciók előállítása

Gateway® klónozással hoztuk létre a fehérjetermelő konstrukciókat a gyártó által ajánlott protokoll alapján (Katzen, 2007). Első lépésként 3 *Arabidopsis* gént választottunk ki (AtGPXL2, AtGPXL3 és AtGPXL8), és attB rekombinációs felismerő helyet tartalmazó oligonukleotidok (3. melléklet) segítségével a megfelelő szekvenciákat felamplifikáltuk. Templátként a lúdfüvből izolált RNS-ből átírt cDNS-eket használtuk. Az AtGPXL3 esetén a transzmembrán régiót (első 34 aminosav) kódoló szekvenciát kivettük, mivel előzetes kísérletek alapján zavarta a fehérje termeltetését. Gélelektroforézises futtatást követően tisztítottuk a termékeket, majd BP klonáz enzim hozzáadásával pDONR201 vektorba juttattuk azokat (35S promótert, kanamicin rezisztenciát tartalmazott). Az így kapott plazmidokat *Escherichia coli* DH5α baktériumokban szaporítottuk fel, majd izolálást követően PCR reakcióval és szekvenálattal ellenőriztük. LR klonáz segítségével pETG10a végleges vektorba juttattuk a génkonstrukciókat (T7/lacO promótert, 6His fúziót, ampicillin rezisztenciát tartalmazott). A plazmidok felszaporítása *E.coli* DH5α sejtekben, és tisztításuk után fehérjetermeltetésre alkalmas *E. coli* (BL21) *Rozetta2* vagy *Origami* sejtvonalakba transzformáltuk őket.

4.11.2. Rekombináns fehérjék tisztítása

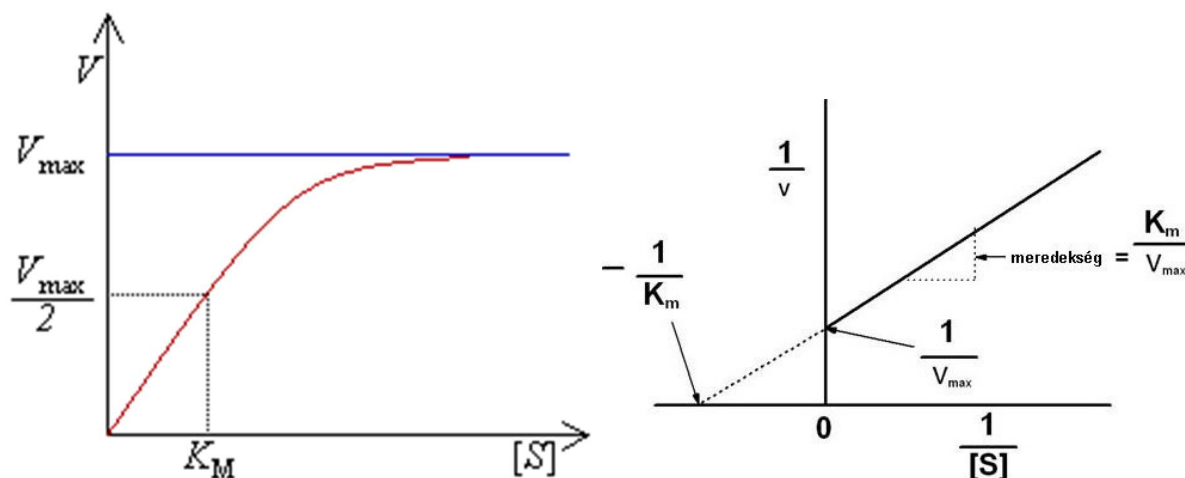
A rekombináns fehérjék tisztítását De Col és mtsai (2017) által leírt módszer alapján végeztük kisebb módosításokkal. A fehérjetermelő konstrukciókat tartalmazó *E. coli* (BL21) *Rozetta2* vagy *Origami* baktériumokat 100 µM ampicillinnel kiegészített LB táptalajon (1% tripton, 0.5% élesztő kivonat, 1% NaCl, 1,5% agar, pH 7.0) növesztettük 37°C-on egy napon át. Ezt követően ampicillines LB tápoldatban egy-egy telepéből indító kultúrát készítettünk. 10-10 ml

indító kultúrát adva 500-500 ml ampicillines LB tápoldathoz 37°C-on rázatva növesztettük a kultúrákat 600nm-en mért 0,8 optikai denzitásig (OD). Mintavételt követően 0,5 mM izopropil- β -D-thiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk a fehérjék termelését, a kultúrákat további 24 órán keresztül 15-20°C-on ráztuk. A sejteket centrifugálással begyűjtöttük (10 perc, 8000 g, 4°C), majd pufferben visszaoldottuk (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 7,4), hozzáadva 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF). A sejtek feltáráshoz és a nukleinsavak bontásához lizozimet, és DNáz enzimet használtunk fél órán keresztül, majd jeges vízben történő szonikálást követően centrifugáltuk a fehérje oldatot (20 perc, 21000 g, 4°C), hogy megszabaduljunk a törmeléktől. A továbbiakban a felülúszót 40 μ m pórusátmérőjű szűrőn szűrtük, majd HiTrap™ oszlopra vittük fel. Mivel a termelt fehérjénk 6 His fűzős aminosavcsoportot tartalmaztak a C-terminális végükön, ennek segítségével képesek kötődni az oszlop nikkel ionnal töltött szemcséihez. 20 mM imidazollal kiegészített pufferes mosást követően (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 7,4) a fehérjénket 200 mM imidazollal kiegészített pufferrel eluáltuk. Az oszlopról lemosott frakciókból, valamint a már korábban az inkubáció során vett mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézisen ellenőriztük. A frakciók fehérjetartalmát Bradford módszere alapján állapítottuk meg (Bradford, 1976).

4.11.3. Szubsztrát specifitás meghatározása

A rekombináns GPXL enzimek szubsztrát specifitásának meghatározását injektorral ellátott „plate reader” spektrofotométer (FLUOstar® Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) segítségével végeztük. A reakcióelegy tartalmazott 10 μ M rekombináns GPXL enzimet, 1 μ M NADPH-függő tioredoxin reduktáz-a-t (NTRa) vagy glutation reduktázt (GR), 10 μ M tioredoxint (TRXh2, TRXh3 vagy TRXh9) vagy 0,5 mM redukált glutationt (GSH), 0,4 mM NADPH-t, valamint 0,2 mM H₂O₂-t, kumén hidroperoxidot (CHP), vagy terc-butil-hidroperoxidot (TBH) 100 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) 100 μ l végtérfogatban. A reakció a beépített injektor segítségével való szubsztrát hozzáadásával indult, kontrollként a reakcióelegy egyes összetevőit nem tartalmazó reakciókat is összeállítottunk. A NADPH oxidációt 340 nm-en detektáltuk, az aktivitást előzetes 0-1 mM NADPH kalibráció alapján számítottuk ki. 1 U-nak vettük az 1 perc alatt 1 nmol NADPH oxidációjára képes enzim aktivitását. További vizsgálatra kiválasztottuk a rekombináns AtGPXL8 enzimet, mely esetén a kapott aktivitás adatokból különböző szubsztrát koncentrációknál Michaelis- Menten kinetikai paramétereket határoztuk meg (maximális reakciósebesség, v_{max} ; Michaelis-Menten

állandó, K_M), ezen kívül alkalmaztuk a Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolási módot is (14. ábra).



14. ábra Michaelis-Menten féle enzimkinetika (balról), valamint annak Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolása (jobbról). K_M : Michaelis-Menten állandó, ami a maximális sebesség feléhez tartozó szubsztrát koncentráció; v : reakciósebesség; v_{max} : maximális reakciósebesség; $[S]$: szubsztrát koncentráció (Wunderlich és Szarka, 2014).

4.12. Promóter analízis

Az *AtGPXL* gének szekvenciáit a The Arabidopsis Information Resource (TAIR) adatbázisában (<https://www.arabidopsis.org>) azonosítottuk. A további vizsgálat céljából a szekvenciák start kodon előtti maximum 1,5 kbp hosszú szakaszán cisz-ható elemeket kerestünk a PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) adatbázisban.

4.13. Korrelációs analízis

A különböző fiziológiai paraméterek közötti korrelációk megállapításához *Pearson*-féle korrelációs analízist végeztünk R program segítségével (<http://www.R-project.org>). A kapott értékek +1 és -1 között változnak, ahol a szélső (+1 és -1) értékek jelzik a nagy mértékű pozitív vagy negatív korrelációt az összehasonlított paraméterek között. A 0-hoz közelítő értékek viszont a köztük lévő korreláció gyenge mértékét vagy hiányát jelentik. Korrelációs mátrixban a piros színek a negatív, a kék színek a pozitív korrelációt mutatják, az árnyalatok pedig a korrelációk mértékére utalnak.

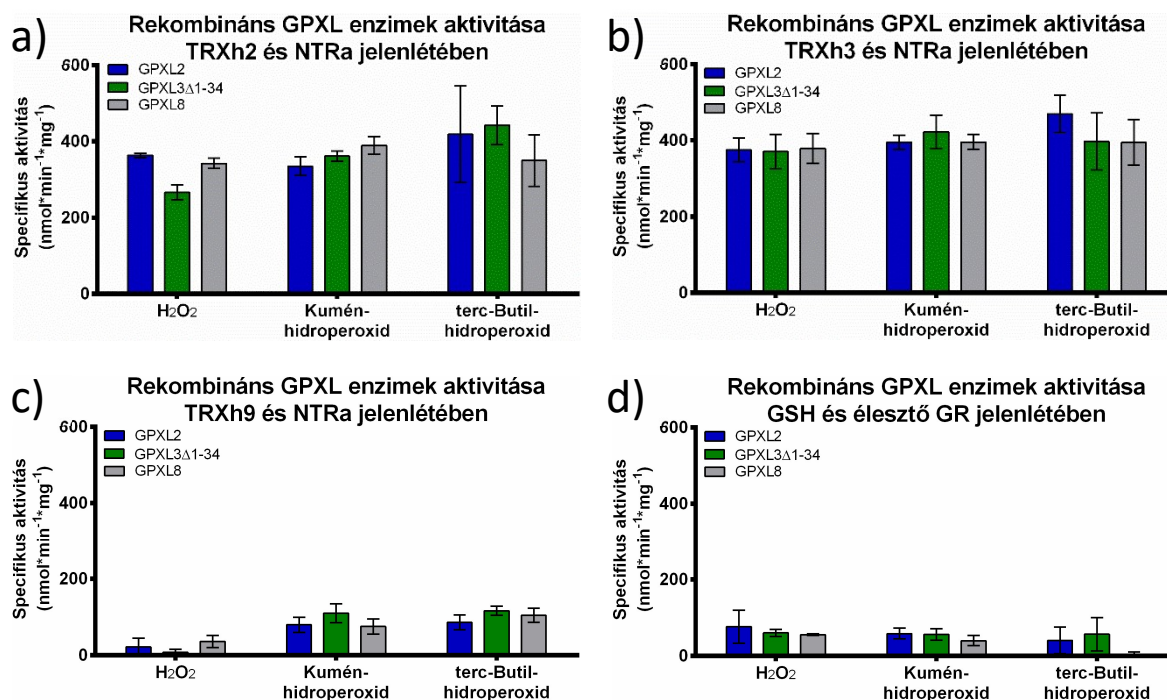
4.14. Statisztikai analízis

A kísérleteket minimum három biológiai ismételésben végeztük el, legalább 3-3 párhuzamos méréssel. A dolgozatban bemutatott adatok a biológiai ismétlések összevont adataiból számított átlag értékek a hozzá tartozó szórással (standard error, $\pm$ SE). A vizsgálati eredmények matematikai, statisztikai feldolgozását és kiértékelését a SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, USA) szoftverrel végeztük. A kontrolltól vagy vad típustól való különbségeket Student-féle t-próba segítségével határoztuk meg (minden kísérletben külön jelölve), ahol a szignifikáns különbségeket az alábbiak szerint jelöltük: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5. Eredmények

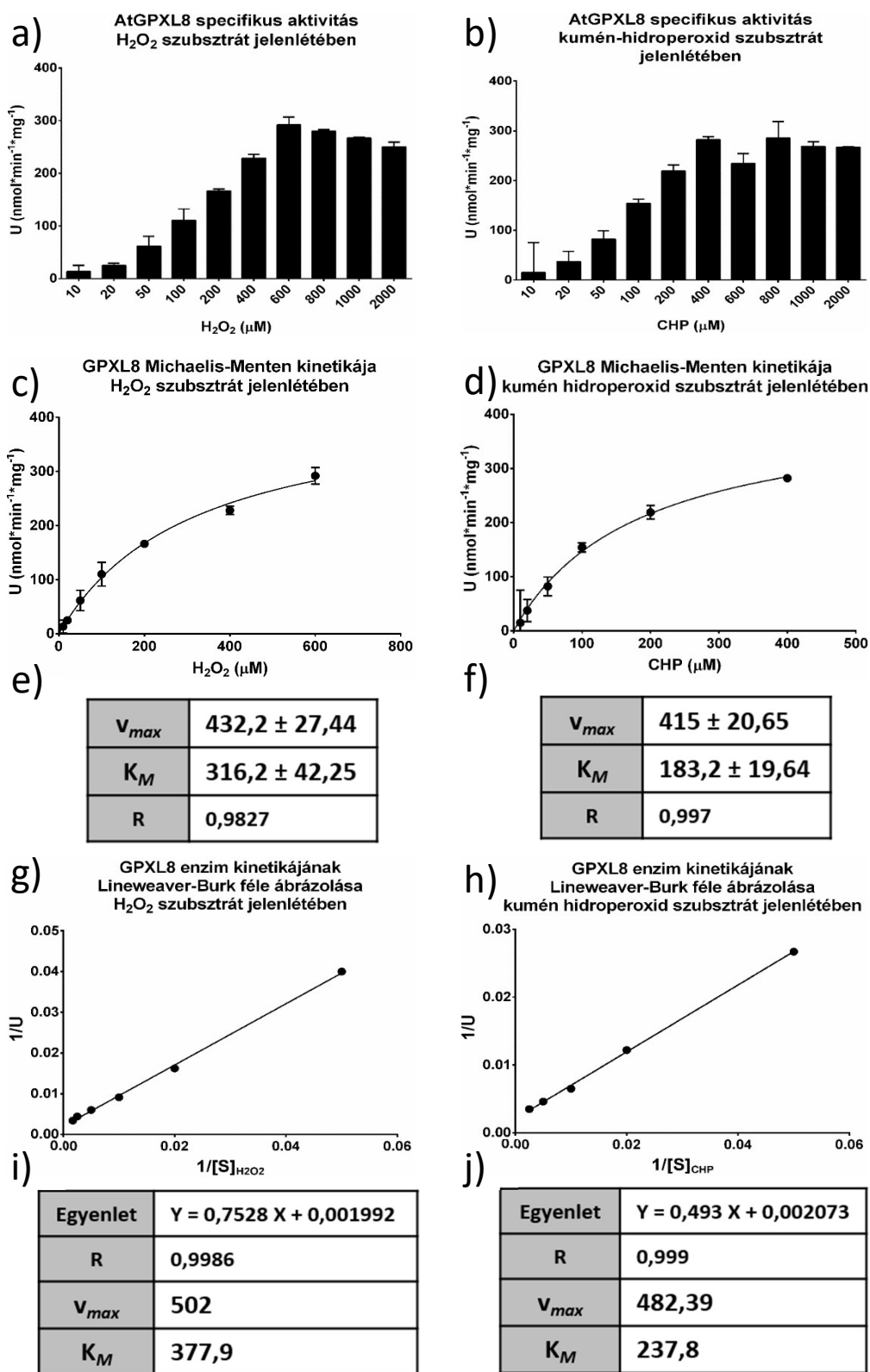
5.1. Rekombináns GPXL fehérjék aktivitása

Az *Arabidopsis* GPXL enzimek (oxidatív) stressz válaszbán betöltött szerepének vizsgálata/tanulmányozása során meghatároztuk az *Escherichia coli* BL21 sejtekben termeltetett rekombináns GPXL2, -3 és -8 izoenzimek szubsztrát specifitását. Különböző peroxidok (H_2O_2 , kumén hidroperoxid (CHP) és terc-butil hidroperoxid (TBH)) lebontásának hatékonyságát néhány tioredoxin és glutation redukáló komponens jelenlétében hasonlítottuk össze (15. ábra). A kapott eredmények azt mutatják, hogy a TRXh2 és NTRa, valamint a TRXh3 és NTRa redukáló rendszerek jelenlétében igen, míg TRXh9 és NTRa, valamint GSH és GR jelenlétében a GPXL enzimek nem képesek a vizsgált peroxidok hatékony lebontására.



15. ábra Rekombináns *Arabidopsis* glutation peroxidáz szerű (GPXL) enzimek aktivitása különböző szubsztrátok (H_2O_2 , kumén hidroperoxid, terc-butil hidroperoxid) és különböző redukáló rendszerek **a)** tioredoxin-h2 (TRXh2) és NADPH függő tioredoxin redukáz-a (NTRa), **b)** tioredoxin-h3 (TRXh3) és NTRa, **c)** tioredoxin-h9 és NTRa, valamint **d)** glutation (GSH) és élesztő glutation redukáz (GR) jelenlétében. Átlag±SE, n=6.

Mivel mindhárom rekombináns enzim hasonló aktivitásokat mutatott, így a nagyobb mennyiségben rendelkezésünkre álló GPXL8 enzimkinetikai paramétereit határoztuk meg H_2O_2 és CHP szubsztrátot használva (16. ábra). A reakcióelegy redukáló rendszerként rekombináns TRXh3 és NTRa enzimeket tartalmazott.

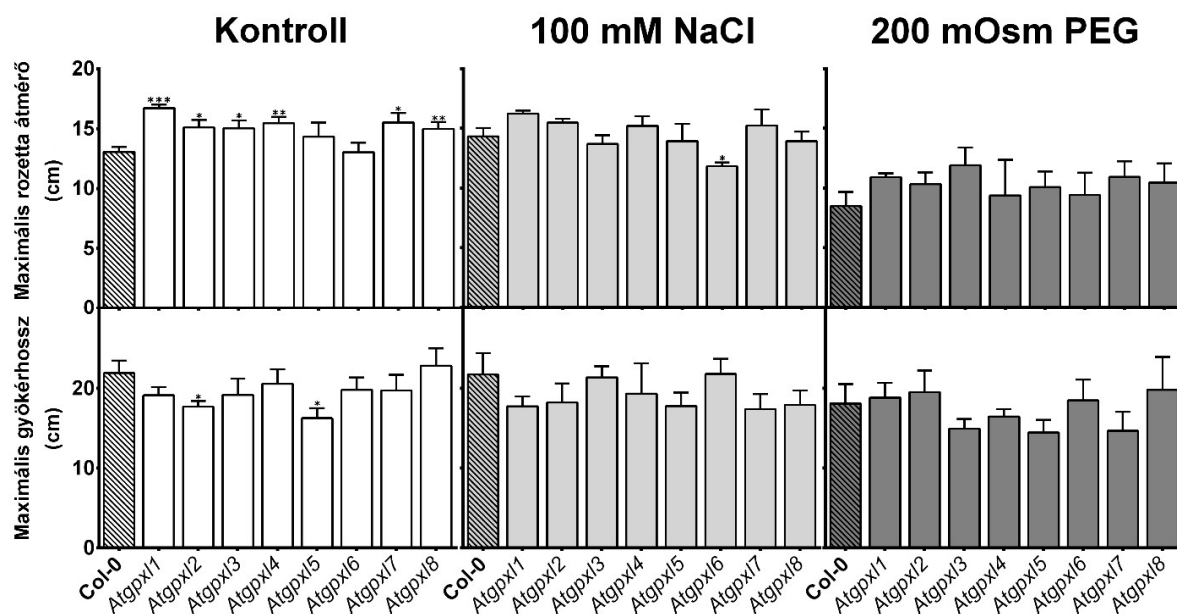


16. ábra Rekombináns glutation peroxidáz szerű enzim 8 (GPXL8) enzimkinetikájának vizsgálata H_2O_2 és kumén hidroperoxid (CHP) szubsztrátok jelenlétében. Rekombináns GPXL8 aktivitása különböző koncentrációjú **a)** H_2O_2 hozzáadásával **b)** CHP szubsztráttal. GPXL8 aktivitás Michaelis-Menten kinetikája **c)** H_2O_2 szubsztráttal **d)** CHP szubsztráttal **e) f)** A görbék alapján GraphPad6.0 programmal számoltatott maximális sebesség (v_{max}) és Michaelis állandó (K_M) értékek. GPXL8 enzim kinetikájának Lineweaver-Burk féle linearizációja **g)** H_2O_2 szubsztráttal és **h)** CHP szubsztráttal. **i) j)** az egyenesek egyenletéből számított v_{max} ($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ protein}^{-1}$) és K_M (μM) értékek. Átlag $\pm$ SE, n=6.

GraphPad6.0 segítségével Michaelis-Menten görbét illesztettünk, majd a program segítségével számoltunk maximális sebességet (v_{max}) és Michaelis állandókat (K_M). Ezen kívül a Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolás segítségével kapott egyenlet alapján is kiszámoltuk ezeket az értékeket. Hasonlóak a két szubsztráttal kapott maximális aktivitások, kicsi különbség a K_M állandóban van, ami a maximális aktivitás feléhez tartozó szubsztrát koncentrációt jelenti, mely ebben az esetben CHP szubsztráttal alacsonyabb, tehát kevesebb szubsztrát is elég a maximális aktivitás 50%-ának eléréséhez. Ez azt jelzi, hogy a szerves hidroperoxidhoz nagyobb az AtGPXL8 affinitása, mint a H_2O_2 -hoz.

5.2. *Atgpxl* T-DNS inszerciós mutánsok fiziológiai vizsgálata

Az AtGPXL izoenzimiek só- és ozmotikus stressz válaszbán betöltött fiziológia szerepét inszerciós mutánsok segítségével (*Atgpxl1-8*) vizsgáltuk. 100 mM NaCl-dal, illetve 200 mOsm polietilén glikollal (PEG6000) egészítettük ki a 6 hetes, hidropónikusan nevelt Col-0 vad típus és *Atgpxl* mutáns növények tápoldatát, majd két napig tartó kezelést követően összehasonlítottuk a növények rozettájának maximális átmérőjét, valamint gyökérhosszát (**17. ábra**).



17. ábra Hidropónikusan nevelt 6 hetes *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és mutáns növények maximális rozetta átmérőjének és gyökér hossz értékeinek átlaga és szórása (SE, n=6) kontroll körülmények között, valamint 2 nap 100 mM NaCl vagy 200 mOsm polietilén glikol 6000 (PEG) kezelés után. Statisztikai elemzés során a mutáns növények értékeit mindig a Col-0 értékeivel vetettük össze Student-féle t-próba segítségével, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbi szintek szerint: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Általánosságban megállapítható, hogy a vad típus és mutáns növények növekedése hasonló volt (**1. melléklet**, **2. melléklet**), habár az *Atgpxl6* kivételével a mutáns növények rozettája

kontroll körülmények között nagyobb volt, mint a vad típusé, stressz kezelést követően azonban nem volt szignifikáns különbség közöttük. A mutáns növények gyökérhossza általában hasonló volt a Col-0-hoz, ám az *Atgpxl2* és *Atgpxl5* esetében kontroll körülmények között rövidebbek voltak a főgyökerek (**17. ábra**).

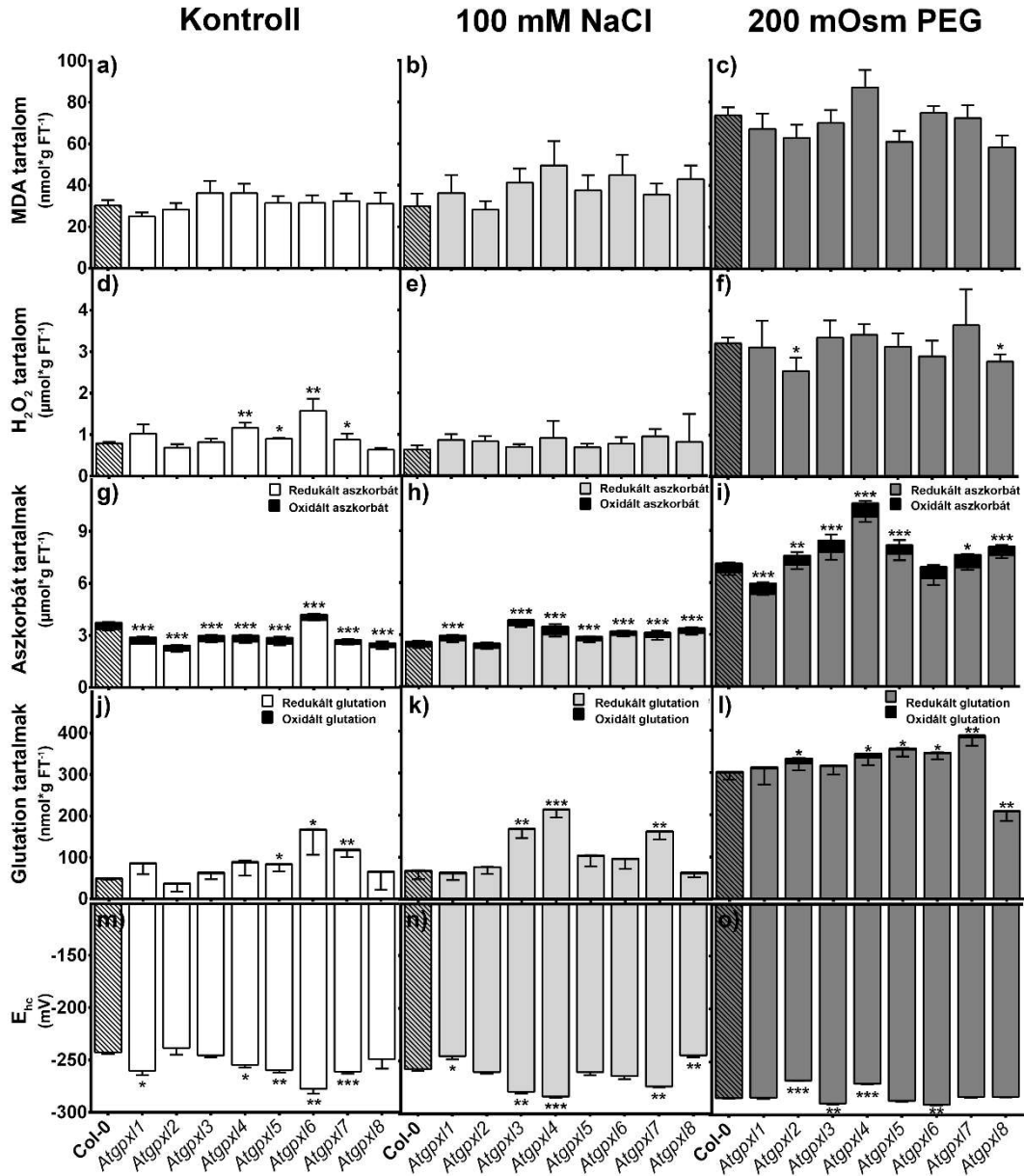
Mivel a glutation peroxidázok egyik feladata a H_2O_2 és szerves peroxidok lebontása, így megvizsgáltuk a növények hajtásában és gyökerében a H_2O_2 akkumulációját és a lipidperoxidáció mértékét jelző MDA tartalmakat (**18. ábra**; **19. ábra**). Általánosságban elmondható, hogy a gyökerekben körülbelül fele mennyiségű MDA mutatható ki, illetve tizedannyi H_2O_2 szinteket detektáltunk a hajtásokban mértekhez képest.

Kontroll körülmények között az *Atgpxl4*, -5, -6, -7 növények hajtásában és az *Atgpxl5*, -8 mutánsok gyökerében szignifikánsan magasabb H_2O_2 szinteket detektáltunk, azonban az MDA tartalmakban nem volt eltérés. 150 mM NaCl kezelés nem emelte meg a peroxid szinteket sem a hajtásban, sem a gyökérben, viszont 200 mOsm PEG hatására mind a H_2O_2 , mind a MDA szintek jelentősen, két-háromszorosára emelkedtek a hajtásokban, kivétel ez alól az *Atgpxl2* és -8 mutánsok, melyekben a vad típusnál alacsonyabb H_2O_2 értékeket detektáltunk. A növények gyökereiben nem tapasztaltunk lipidperoxid tartalom emelkedést PEG kezelésre, sőt, az *Atgpxl1* mutánsban még csökkent is a MDA szint. A H_2O_2 tartalom viszont néhány növény esetében megemelkedett, szignifikánsan csak az *Atgpxl6* esetében.

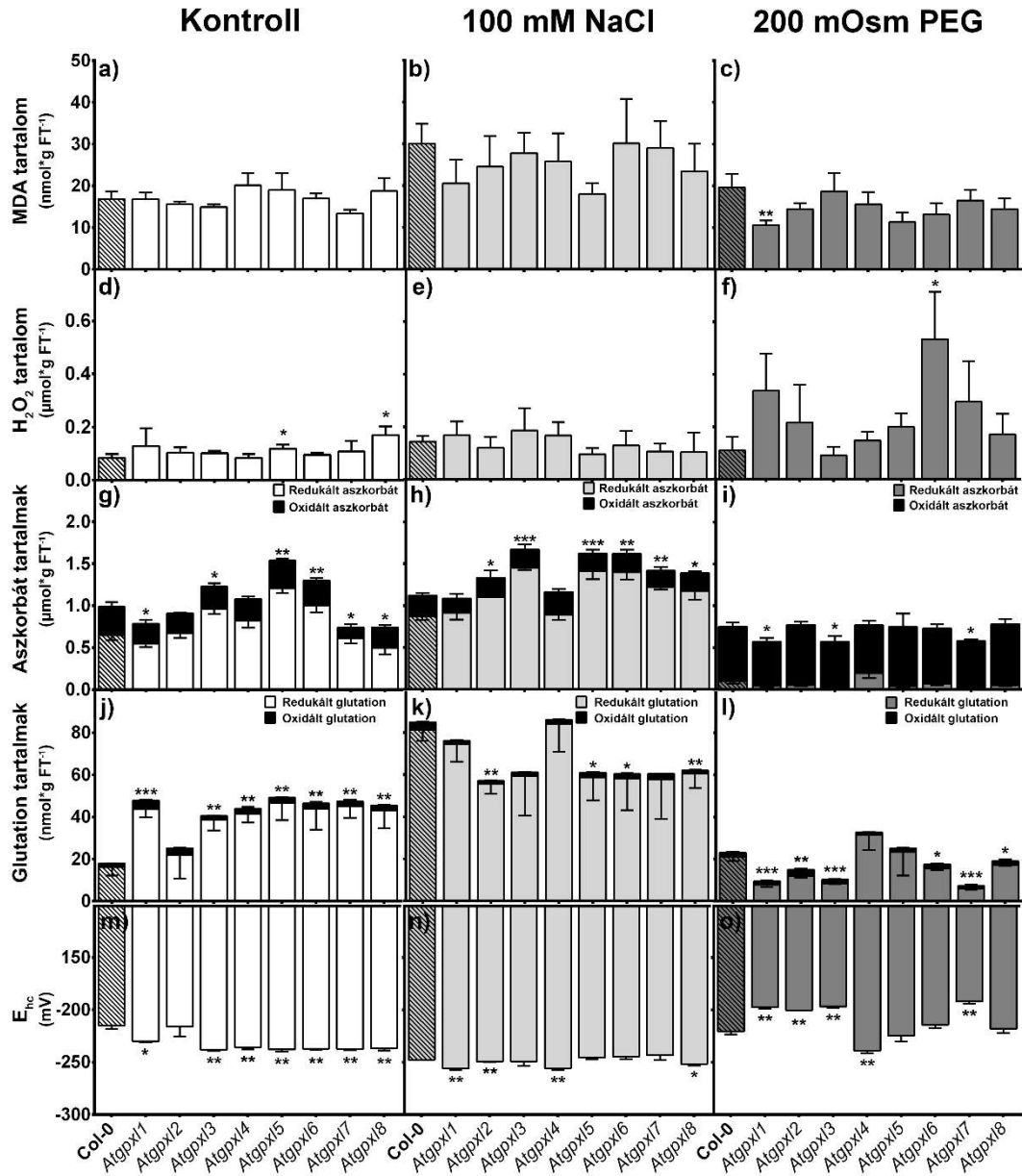
Mivel a vizsgált paraméterek alapján a mutáns növények nem minden esetben voltak érzékenyebbek a stresszkezelésekre, kíváncsiak voltunk, vajon ennek hátterében állhat-e egyéb védekező mechanizmusok aktiválódása. Ezen vizsgálatok első lépéseként megmértük a 6 hetes lúdfüvek aszkorbát és glutation tartalmát (**18. ábra**; **19. ábra**), illetve ezen antioxidánsok redukált és oxidált formájának mennyiségét. A mért redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation tartalmakból fél cella redox potenciált (E_{hc}) számítottunk, ami közelítőleg megadja a növények redox állapotát (**18. ábra**; **19. ábra**). A hajtásokban megközelítőleg háromszoros mennyiségű aszkorbát, és ötszörös mennyiségű glutation szinteket mértünk. Ezen kívül a hajtások számított redox potenciálja általában negatívabb volt a gyökerekéhez képest.

Kontroll körülmények között a mutáns hajtások össz aszkorbát tartalma alacsonyabb volt a vad típusnál, kivétel ez alól az *Atgpxl6*, ahol szignifikánsan magasabb volt az aszkorbát szint, ráadásul a gyökérben is. Ezen kívül az *Atgpxl3* és -5 növények gyökerében megemelkedett, míg az *Atgpxl1*, -7 és -8 gyökereiben lecsökkent össz aszkorbát értékeket detektáltunk. Az össz glutation tartalom kontroll állapotban az *Atgpxl5*, -6 és -7 mutánsok hajtásában szignifikánsan magasabb volt a Col-0-hoz képest, míg a gyökerekben az összes mutáns növény esetében jóval

magasabb glutation mennyiségeket mértünk a vad típushoz képest, kivétel ez alól az *Atgpx12*, ahol ez nem volt szignifikáns emelkedés. A számított E_{hc} értékek a mutáns növények esetében azonban negatívabbak voltak, tehát redukáltabb volt a redox állapotuk a vad típushoz képest, az *Atgpx12*, -3 és -8 mutánsok gyökerében, valamint az *Atgpx12* hajtásában nem volt szignifikáns a különbség.



18. ábra *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpx1* mutáns növények hajtásában mért fiziológiai paraméterek értékeinek átlaga és szórása (SE, n=9-12) kontroll körülmények között, illetve két napos 100 mM NaCl, vagy 200 mOsm PEG kezelés után: **a) b) c)** Malondialdehid tartalmak **d) e) f)** H₂O₂ tartalmak **g) h) i)** Aszkorbát tartalmak, az oszlopok alsó része a redukált, a felső sötét része az oxidált forma mennyiségét mutatja **j) k) l)** Glutation tartalmak az oszlopok alsó része a redukált, a felső sötét része az oxidált forma mennyiségét mutatja **m) n) o)** A glutation tartalmakból számított fél cella redox potenciál (E_{hc}), a pozitívabb értékek nagyobb oxidáltsági állapotot mutatnak. Statisztikai elemzés során a mutáns növények értékeit mindig a Col-0 értékeivel vetettük össze Student-féle t-próba segítségével, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbi szintek szerint: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.



19. ábra *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpx1* mutáns növények gyökerében mért fiziológiai paraméterek értékeinek átlaga és szórása (SE, n=9-12) kontroll körülmények között, illetve két napos 100 mM NaCl, vagy 200 mOsm PEG kezelés után: **a) b) c)** Malondialdehid tartalmak **d) e) f)** H₂O₂ tartalmak **g) h) i)** Aszkorbát tartalmak, az oszlopok alsó része a redukált, a felső sötét része az oxidált forma mennyiségét mutatja **j) k) l)** Glutation tartalmak az oszlopok alsó része a redukált, a felső sötét része az oxidált forma mennyiségét mutatja **m) n) o)** A glutation tartalmakból számított fél cella redox potenciál (E_{hc}), a pozitívabb értékek nagyobb oxidáltsági állapotot mutatnak. Statisztikai elemzés során a mutáns növények értékeit mindig a Col-0 értékeivel vetettük össze Student-féle t-próba segítségével, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbi szintek szerint: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

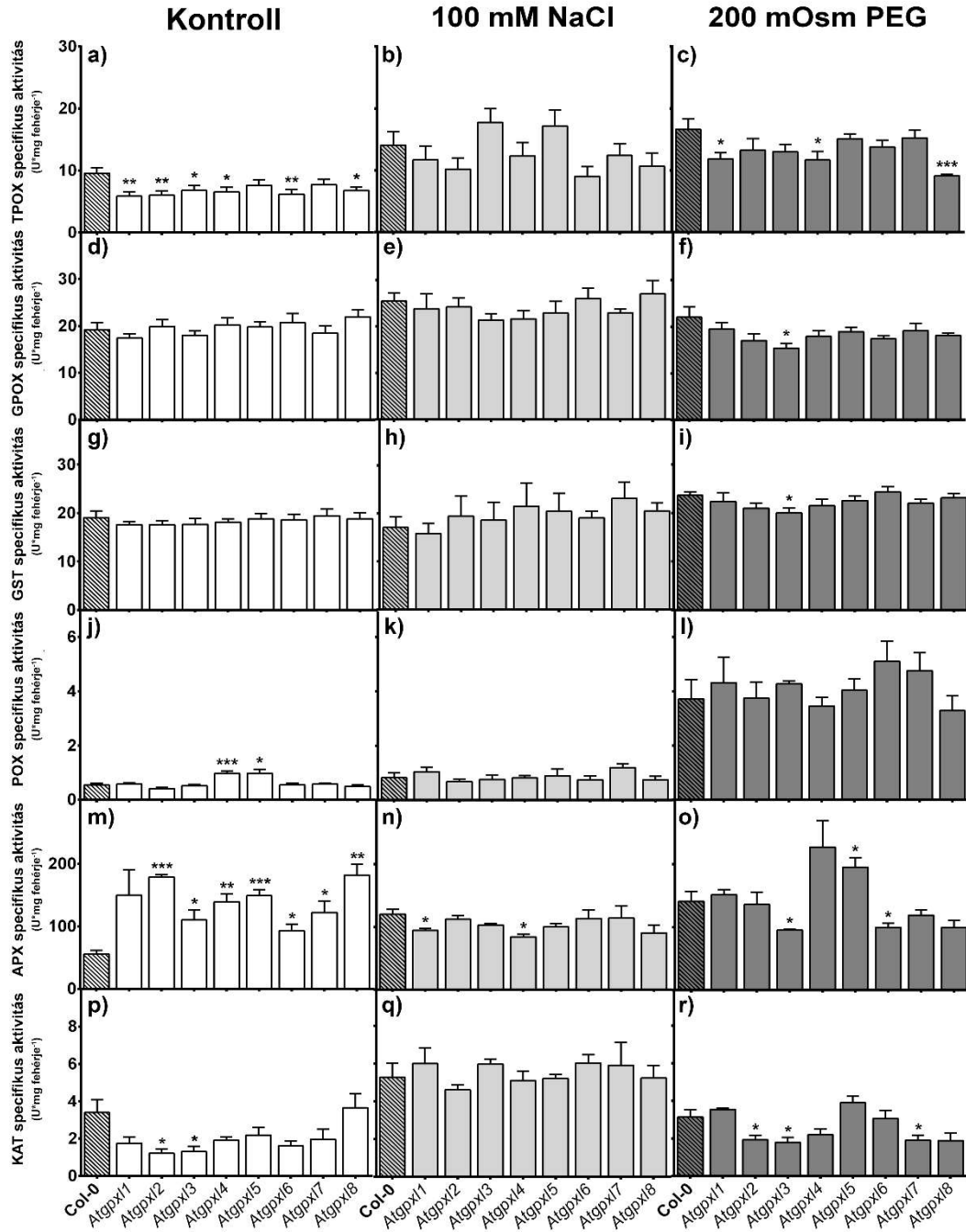
Kezelések hatására teljesen eltérően változtak a nem-enzimatis antioxiidáns tartalmak a hajtásokban, illetve gyökerekben. 150 mM NaCl kezelés hatására a hajtásokban nem, a gyökerekben viszont megemelkedett az össz aszkorbát tartalom. Mivel a Col-0 növények hajtásában a kezelés hatására még le is csökkent az aszkorbát szint, a mutánsokban pedig nem változott, ennek következtében a mutánsok aszkorbát tartalma szignifikánsan magasabb volt a

vad típushoz képest, kivéve az *Atgpxl2*-t. A mutánsok gyökerében szintén magasabb aszkorbát értékeket mértünk mint a vad típusban, kivétel ez alól az *Atgpxl1* és -4, amelyek nem különböztek.

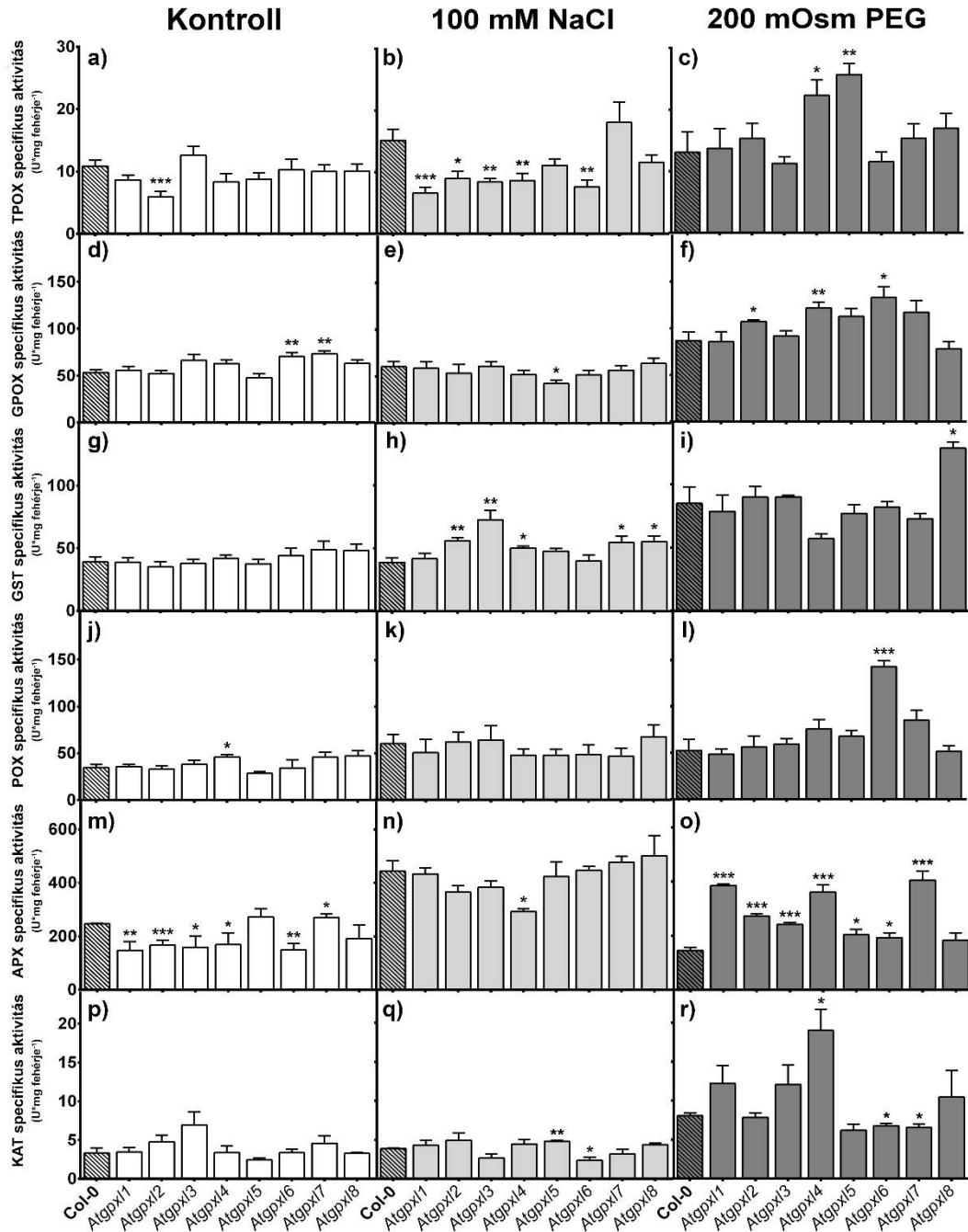
200 mOsm PEG kezelés hatására viszont a hajtások aszkorbát tartalma emelkedett meg jelentősen, a legtöbb mutáns esetén még nagyobb mértékben is, kivéve az *Atgpxl6*-ot, amiben hasonló volt a vad típushoz, illetve az *Atgpxl1*-t, amiben viszont csak kisebb mértékben emelkedett az aszkorbát szint, így alacsonyabb volt a vad típushoz képest. Ezzel ellentétben a növények gyökerében PEG kezelés hatására lecsökkent az aszkorbát mennyiség, és drasztikusan megnőtt az oxidált forma (DHA) aránya, *Atgpxl1*, -3 és -7 mutánsokban még nagyobb mértékben is mint Col-0-ban. Az össz glutation tartalom sókezelésre az *Atgpxl3*, -4 és -7 mutánsok hajtásában megemelkedett, és szignifikánsan magasabb volt a vad típusnál. A NaCl kezelés általában megemelte a gyökerek össz glutation mennyiségét, viszont a mutánsoknál kisebb mértékben, így *Atgpxl2*, -5, -6 és -8 esetén az össz glutation szint szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típusnál mérthez képest. PEG kezelésre hasonlóan az aszkorbát tartalmakhoz, a glutation tartalmak is megemelkedtek a hajtásokban és lecsökkentek a gyökerekben. Az *Atgpxl8* hajtásában a glutation mennyiség csak kis mértékben emelkedett meg, így végül szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típushoz képest, viszont az *Atgpxl1* és -3 kivételével a mutánsoknál szignifikánsan nagyobb glutation szinteket mértünk. A PEG indukálta ozmotikus stressz eredményeképp a mutáns gyökerek glutation tartalma lecsökkent, így *Atgpxl-4* és -5 kivételével szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a Col-0-hoz képest. A számított E_{hc} érték NaCl kezelés hatására néhány mutáns hajtásánál magasabb volt (*Atgpxl1* és -8; kb -240 mV). Másoknál (*Atgpxl3*, -4 és -7; -274 mV és -283 mV között) negatívabb, míg gyökerek esetében az *Atgpxl1*, -2, -4 és -8 mutánsoknál szignifikánsan negatívabb (kb. -250 mV) redox potenciálokat tapasztaltunk a GSH és GSSG formák arányának eltolódásából adódóan. PEG kezelésre általában a hajtások és gyökerek ellenkezően reagáltak, hajtások redukáltabb, gyökerek valamivel oxidáltabb állapotban voltak. Az ozmotikus stressz hatására az *Atgpxl2* és -4 hajtásában a Col-0-hoz képest magasabb ($-267 \pm 0,4$ mV és $-270 \pm 0,6$ mV), az *Atgpxl3* és -6 esetén alacsonyabb (kb. -290 mV) E_{hc} értékeket számítottunk. Ezzel szemben az *Atgpxl4* gyökerében negatívabb ($-239 \pm 2,3$ mV) az *Atgpxl1*, -2, -3 és -7 esetén a vad típushoz képest oxidáltabb redox potenciált tapasztaltunk PEG kezelés után, ami ezen mutáns növények kisebb toleranciáját jelzi ozmotikus stresszre.

Az enzimatisz antioxiánsokban bekövetkezett változás vizsgálata során meghatároztuk még a glutation peroxidáz (GPOX), glutation transzferáz (GST), gvajakol peroxidáz (POX),

aszorbát peroxidáz (APX) és kataláz (KAT) enzimek aktivitását (20. ábra; 21. ábra). Általánosságban elmondható, hogy a gyökerekben a specifikus enzimaktivitások magasabbak, mint a hajtásokban.



20. ábra *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpx1* mutáns növények hajtásában mért antioxidáns enzimek aktivitásai (átlag $\pm$ SE, $n=9-12$) két napos 100 mM NaCl illetve 200 mOsm PEG kezelést követően: **a) b) c)** Tioeredoxin peroxidáz (TPOX) specifikus aktivitás **d) e) f)** Glutation peroxidáz (GPOX) specifikus aktivitás **g) h) i)** Glutation transzferáz (GST) specifikus aktivitás **j) k) l)** Gvajakol peroxidáz (POX) specifikus aktivitás **m) n) o)** Aszkorbát peroxidáz (APX) specifikus aktivitás **p) q) r)** Kataláz (KAT) specifikus aktivitás Statisztikai elemzés során a mutáns növények értékeit mindig a Col-0 értékeivel vetettük össze Student-féle t-próba segítségével, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbi szintek szerint: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



21. ábra *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpx1* mutáns növények gyökerében mért antioxidáns enzimek aktivitásai (átlag $\pm$ SE, $n=9-12$) két napos 100 mM NaCl illetve 200 mOsm PEG kezelést követően: **a) b) c)** Tioredoxin peroxidáz (TPOX) specifikus aktivitás **d) e) f)** Glutathion peroxidáz (GPOX) specifikus aktivitás **g) h) i)** Glutathion transferáz (GST) specifikus aktivitás **j) k) l)** Gvajakol peroxidáz (POX) specifikus aktivitás **m) n) o)** Aszkorbát peroxidáz (APX) specifikus aktivitás **p) q) r)** Kataláz (KAT) specifikus aktivitás Statisztikai elemzés során a mutáns növények értékeit mindig a Col-0 értékeivel vetettük össze Student-féle t-próba segítségével, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbi szintek szerint: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

A TPOX aktivitást CHP szubsztrát és rekombináns TRXh3 és NTRa redukáló rendszer segítségével határoztuk meg, a hozzáadott NADPH fogyását detektálva. A hajtásban (5,85 – 17,73 U/mg fehérje) és gyökérben (5,96 – 25,69 U/mg fehérje) mért TPOX aktivitások nagyságrendben hasonlóak (**20. ábra**; **21. ábra**). Kontroll körülmények között a legtöbb

mutáns hajtásában szignifikánsan alacsonyabb TPOX aktivitást detektáltunk a vad típushoz képest, kivéve az *Atgpxl5* és -7 mutánsokban. Ez igazolhatja a GPXL enzimek TPOX aktivitását. Viszont gyökerek esetében csak az *Atgpxl2* mutánsnál volt alacsonyabb az aktivitás érték a Col-0-val összehasonlítva. Sókezelés hatására a hajtásban megemelkedett a TPOX aktivitás, viszont nem volt szignifikáns különbség a növények értékei között. Ellenben gyökérben csupán a vad típusban és az *Atgpxl7*-ben emelkedett meg az aktivitás, az *Atgpxl1*, -2, -3, -4 és -6 mutánsokban szignifikánsan alacsonyabb értékeket kaptunk. PEG kezelés okozta ozmotikus stressz hatására a legtöbb hajtásban megemelkedett a specifikus TPOX aktivitás, leginkább a vad típusban, viszont az *Atgpxl1* és -4 növényekben alacsonyabb volt, sőt, az *Atgpxl8* mutánsban alig indukálódott ($9,1 \pm 0,7$ U/mg fehérje), a vad típusú hajtások aktivitásának ($16,6 \pm 4,4$ U/mg fehérje) csupán fele volt. Ezzel ellentétben gyökérben viszont vagy nem volt különbség, vagy még magasabb is volt az aktivitás a vad típushoz képest az *Atgpxl4* és -5 esetén.

A GPOX aktivitásokat is CHP szubsztrát jelenlétében, azonban GSH és élesztő GR redukáló rendszer segítségével határoztuk meg. Hajtásban 17-22 U/mg fehérje közötti aktivitásokat, míg gyökérben 47-73 U/mg fehérje értékeket detektáltunk, melyek PEG kezelés hatására 133 U/mg fehérjéig emelkedtek meg. Legtöbb esetben nem volt szignifikáns különbség a mutánsok és a vad típus között, bár néhány mutánsban a Col-0-tól magasabb aktivitást mértünk (kontroll *Atgpxl6* és -7, valamint PEG kezelt *Atgpxl2*, -4 és -6 gyökerekben).

GPOX aktivitással több GST izoenzim is rendelkezik. A GST aktivitást CDNB szubsztráttal meghatározva nem találtunk különbséget a kontroll körülmények között nevelt vad típus és mutáns növények GST aktivitásában, azonban sókezelést követően az *Atgpxl2*, -3, -4, -7 és -8 mutánsok gyökerében magasabb, míg PEG kezelésre az *Atgpxl8*-ban jelentősen magasabb aktivitásokat mértünk.

A vizsgált genotípusok POX aktivitásában sem találtunk jelentős eltéréseket, bár az *Atgpxl4* hajtásában és gyökerében valamint az *Atgpxl5* hajtásában kontroll körülmények között is szignifikánsan magasabb volt a POX aktivitás. Az alkalmazott NaCl kezelés kisebb, míg a PEG kezelés jelentős POX aktivitás indukciót váltott ki a növények hajtásában, azonban a gyökereket vizsgálva csak az *Atgpxl6* esetében következett be ilyen mértékű aktiválódás.

Az APX aktivitása azonban jelentősebben változott a mutáns növényekben. Kontroll körülmények között hajtásban inkább magasabb, gyökérben inkább alacsonyabb értékeket mértünk. Kezelések hatására a gyökérben megemelkedett az APX aktivitás, PEG kezelésre a mutánsokban nagyobb mértékben, összhangban a mért DHA mennyiségekkel (**19. ábra**).

A KAT aktivitásánál más volt a helyzet, kontroll állapotban *Atgpxl2* és -3 mutánsok hajtásában valamivel alacsonyabb értékeket mértünk. Sókezelésre a hajtásokban mért aktivitás, PEG kezelésre viszont inkább a gyökerekben mért emelkedett meg. Néhány esetben jobban (*Atgpxl4* gyökér), míg más esetben kevésbé (*Atgpxl2*, -3 és -7 hajtás, valamint *Atgpxl6* és -7 gyökér). Az AtGPXL gének expresszióját RT-qPCR-rel vizsgálva a 6 hetes kontroll Col-0 növények hajtásában és gyökerében vizsgált expressziók alapján a hajtásokban magasabb a GPXL transzkript szint (**1. táblázat**). A megállapított sorrend a vizsgálat alapján csökkenő expressziós érték szerint a hajtásban *AtGPXL1*, -2, -8, -7, -6, -5, -3 és -4, a gyökérben pedig *AtGPXL2*, -8, 6, -1, -5, -3, -7 és -4. Mutánsokat vizsgálva az adott GPXL gének expressziója jelentősen lecsökkent, ez alól kivételt csak az *Atgpxl1*-es jelent, amely esetében a T-DNS beépülésének helye a 3' szabályozó régióban van (**6. ábra**), így ebben az esetben a keletkező mRNS-re a mutáció valószínűleg csak kis mértékben hat.

1. táblázat *Arabidopsis thaliana* Col-0 és *Atgpxl* mutáns növényekben kontroll körülmények között vizsgált gének $2^{-\Delta Ct}$ expressziós értékeinek átlaga normalizáció nélkül. A magasabb értékek magasabb expressziós szintet jelölnek.

	GPXL1	GPXL2	GPXL3	GPXL4	GPXL5	GPXL6	GPXL7	GPXL8	DREB2A	DREB2B	MYB2	MYC2	NCED3
HAJTÁS													
Col-0	1.0569	0.4199	0.0086	0.0005	0.0167	0.0202	0.0242	0.0449	0.1019	0.0061	0.0249	0.9220	0.0694
<i>Atgpxl1</i>	0.5786	0.1881	0.0060	0.0002	0.0120	0.0134	0.0208	0.0308	0.1279	0.0047	0.0231	1.4171	0.1933
<i>Atgpxl2</i>	0.8698	0.0139	0.0066	0.0003	0.0120	0.0140	0.0353	0.0460	0.0795	0.0043	0.0589	1.8833	0.4607
<i>Atgpxl3</i>	0.9922	0.2159	0.0004	0.0004	0.0107	0.0092	0.0550	0.0359	0.0970	0.0019	0.0202	1.8363	0.2687
<i>Atgpxl4</i>	0.3213	0.1351	0.0100	ND	0.0107	0.0089	0.0068	0.0510	0.3245	0.0105	0.0569	0.9111	0.1091
<i>Atgpxl5</i>	0.4434	0.2276	0.0058	0.0003	0.0064	0.0139	0.0154	0.0307	0.3386	0.0069	0.0625	1.3187	0.2023
<i>Atgpxl6</i>	0.9940	0.2434	0.0081	0.0002	0.0163	0.0039	0.0275	0.0455	0.3237	0.0079	0.0159	1.7274	0.4695
<i>Atgpxl7</i>	0.6978	0.3251	0.0115	0.0004	0.0137	0.0283	0.0058	0.0505	0.3533	0.0078	0.0546	1.7750	0.4129
<i>Atgpxl8</i>	0.3662	0.3312	0.0063	0.0001	0.0061	0.0170	0.0083	0.0001	0.3883	0.0133	0.0767	0.7074	0.0796
GYÖKÉR													
Col-0	0.0104	0.0312	0.0038	0.0004	0.0081	0.0133	0.0008	0.0273	0.0404	0.0043	0.0081	0.2956	0.0032
<i>Atgpxl1</i>	0.0107	0.0287	0.0026	0.0005	0.0063	0.0085	0.0006	0.0174	0.0464	0.0046	0.0324	0.5018	0.0044
<i>Atgpxl2</i>	0.0092	0.0001	0.0033	0.0010	0.0063	0.0079	0.0018	0.0300	0.2023	0.0087	0.0740	0.5809	0.0205
<i>Atgpxl3</i>	0.0131	0.0180	0.0001	0.0006	0.0053	0.0088	0.0011	0.0278	0.3534	0.0094	0.1259	0.9553	0.0212
<i>Atgpxl4</i>	0.0125	0.0232	0.0029	ND	0.0071	0.0209	0.0009	0.0273	0.5342	0.0165	0.1276	0.5338	0.0094
<i>Atgpxl5</i>	0.0089	0.0119	0.0017	0.0005	0.0021	0.0074	0.0005	0.0232	0.3424	0.0178	0.1118	0.4826	0.0119
<i>Atgpxl6</i>	0.0170	0.0337	0.0024	0.0008	0.0058	0.0005	0.0013	0.0275	0.1485	0.0088	0.0448	0.5506	0.0062
<i>Atgpxl7</i>	0.0302	0.0295	0.0070	0.0006	0.0085	0.0100	0.0002	0.0313	0.1547	0.0097	0.0326	0.5267	0.0046
<i>Atgpxl8</i>	0.0316	0.0448	0.0047	0.0006	0.0056	0.0093	0.0015	0.0001	0.2822	0.0046	0.0340	0.5073	0.0050

Egyidejűleg több *AtGPXL* gén indukcióját vagy down-regulációját fedeztünk fel néhány mutáns esetében, például az *Atgpxl4* és -8 hajtásában, valamint az *Atgpxl5* gyökerében kontroll körülmények között (**22. ábra**).

HAJTÁS	GPXL1	GPXL2	GPXL3	GPXL4	GPXL5	GPXL6	GPXL7	GPXL8	DREB2A	DREB2B	MYB2	MYC2	NCED3
Kontroll	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
100 mM NaCl	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
200 mOsm PEG	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
GYÖKÉR	GPXL1	GPXL2	GPXL3	GPXL4	GPXL5	GPXL6	GPXL7	GPXL8	DREB2A	DREB2B	MYB2	MYC2	NCED3
Kontroll	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
100 mM NaCl	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
200 mOsm PEG	Col-0												
	Atgpx1												
	Atgpx2												
	Atgpx3												
	Atgpx4												
	Atgpx5												
	Atgpx6												
	Atgpx7												
	Atgpx8												
Relatív génexpresszió (log2)				≤ (-3)	(-2.99) - (-2)	(-1.99) - (-1)	(-0.99) - 0	0	0 — 0.99	1 — 1.99	2 — 2.99	3 — 3.99	4 ≤

22. ábra *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpxl* mutáns növények hajtásában és gyökerében kontroll körülmények között, illetve két napos 100 mM NaCl, vagy 200 mOsm PEG kezelés után mért *GPXL* és stressz válaszban szereplő transzkripciós faktorok, valamint abszizinsav bioszintézis géneinek relatív expresszió átlag értékeinek log₂ ábrázolása hőtérképen a megadott skála szerint. A zöld színárnyalatok indukciót, a pirosak repressziót jelölnek.

Az *Atgpxl8* hajtásában a mutáns génnel együtt lecsökkent az *AtGPXL1*, -4, -5 és -7 gének expressziója. Két napos 100 mM NaCl kezelés hatására a vad típusú növények hajtásában leginkább az *AtGPXL6* gén indukálódott, kisebb mértékben az *AtGPXL2* és -8 is, viszont az *AtGPXL1* és -4 gátlódott. Ugyananezen sókezelés hatására a gyökérben az *AtGPXL1*, -3 és -8 gének emelkedett transzkript szintje volt a jellemző. Az izoozmotikus PEG kezelés hatására az *AtGPXL4* expressziós szintje a Col-0 hajtásában és gyökerében egyaránt megemelkedett, viszont a gyökérben az *AtGPXL5* géné lecsökkent. A mutáns növények bizonyos mértékben hasonlóan reagáltak, sóstressz hatására a hajtásukban az *AtGPXL6* indukálódott, kivétel ez alól értelemszerűen az *Atgpxl6* mutánst, de az *AtGPXL2* és -8 indukciója helyett inkább az *AtGPXL3*-é figyelhető meg néhány mutáns esetében. A mutáns növények gyökerében a vad típushoz hasonlóan sókezelésre az *AtGPXL1*, -3 és -8 gének transzkript szintje megemelkedett, de ezek mellett a mutánsok felénél az *AtGPXL7* gén szintje is. Ezen gének 100 mM NaCl kezelésre kimutatható indukciója arra utal, hogy az általuk kódolt géntermékek a sóstressz válaszában fontos szerepet tölthetnek be. PEG kezelés hatására a hajtásokban az *AtGPXL4* és -8 indukciója mellett néhány esetben az *AtGPXL6*-é is megfigyelhető, a gyökerekben pedig leginkább az *AtGPXL1* és -4 aktiválódása, valamint *AtGPXL5* repressziója a jellemző, de ezen kívül a többi *AtGPXL* gén is indukálódik egy-egy mutáns esetében (**22. ábra**).

Néhány só- szárazság- vagy abszcizinsav (ABS) indukálta transzkripciós faktor (*DREB2A*, *DREB2B*, *MYB2*, *MYC2*), valamint az ABS bioszintézisének kulcs enzimének (*NCED3*) expressziós mintázatát is megvizsgálva (**22. ábra**) azt tapasztaltuk, hogy ezen gének transzkript szintjei a legtöbb esetben megemelkedtek a mutáns növények hajtásában és gyökerében is nem csak kezelés hatására, de már kontroll állapotban is. Habár az *AtMYC2* génexpresszió szintje csupán az *Atgpxl2* hajtásában és az *Atgpxl3* gyökerében emelkedett meg szignifikánsan kontroll körülmények között. Az alkalmazott NaCl és PEG kezelések a növények hajtásában leginkább a *DREB2A*, *DREB2B* és *NCED3* gének, míg gyökerében ezeken kívül a *MYB2* transzkripciós szintjének jelentős emelkedését okozták.

Az eddigi eredményeink szervspecifikus eltéréseket mutattak a hajtás és gyökér között, éppen ezért kíváncsiak voltunk a mért paraméterek közötti korrelációkra a hajtásokban és gyökerekben. Kiemelve a kontroll, NaCl- és PEG kezelés során a vad típusú növények hajtásában mért GPOX aktivitást, közepes korreláció figyelhető meg ennek az értéke, valamint a KAT, APX és TPOX aktivitások között ($r=0,84$; $0,68$ és $0,58$), míg a gyökérben inkább korrelál a DHA szinttel, valamint KAT és GST aktivitásokkal ($r=0,91$; $0,99$ és $0,98$) (**23. ábra**). Ezen kívül mind a hajtásban és a gyökérben erős negatív korrelációt tapasztaltunk a TPOX

aktivitás és az E_{hc} között ($r=-0,95$; $-0,93$), ami ebben az esetben azt jelenti, hogy a TPOX aktivitás növekedésével egyidőben negatívabbá vált a redox potenciál, tehát redukáltabbá. A TPOX aktivitás a hajtásban pozitívan korrelált a legtöbb mért antioxidáns enzim aktivitásával, kivéve a KAT aktivitást, míg gyökérben kevésbé szoros korrelációt tapasztaltunk (**24. ábra**).

HAJTÁS										
genotípus:	Col-0	gpx1	gpx2	gpx3	gpx4	gpx5	gpx6	gpx7	gpx8	
E_{SH}	E_{hc}	-0.2947	0.5640	0.1174	0.1443	-0.3129	0.6491	0.9923	-0.2531	0.8805
H ₂ O ₂ szint	H ₂ O ₂	-0.1104	-0.2600	-0.7567	-0.8473	-0.9236	-0.7217	-0.9617	-0.3553	-0.7743
Lipid peroxidáció mértéke	MDA	-0.0634	0.0606	-0.8041	-0.7377	-0.8073	-0.5058	-0.5701	-0.3123	-0.4971
Oxidált nem enzimatisuk antioxidáns tartalom	DHA	-0.4525	-0.4008	-0.8263	-0.8106	-0.8454	-0.8799	-0.8775	-0.3479	-0.6134
	GSSG	-0.4440	-0.4169	-0.8161	-0.7527	-0.9618	-0.3566	-0.8533	-0.5843	1.0000
Redukált nem enzimatisuk antioxidáns tartalom	ASC	-0.2922	-0.1598	-0.7918	-0.7268	-0.9121	-0.6506	-0.9271	-0.3058	-0.7399
	GSH	0.0121	-0.2831	-0.7190	-0.5167	-0.6148	-0.9298	-0.2299	-0.8309	0.8309
Transzaktivátorok expressziós szintje										
	DREB2A	-0.0106	0.9811	-0.3291	-0.0371	0.5056	-0.3496	-0.7938	-0.3366	0.9800
	DREB2B	0.2290	0.9575	-0.4811	-0.3186	-0.1096	0.0117	-0.5337	-0.0656	-0.0842
	MYB2	0.8330	0.9933	0.9711	0.9586	0.9389	0.9850	0.8918	0.9861	0.2253
	MYC2	0.9697	0.9969	0.9999	0.6659	-0.9933	-0.5954	0.9999	0.8426	-0.3966
ABS bioszintézis gén expressziós szintje	NCED3	0.7275	0.7249	0.6883	0.8181	-0.9901	0.3659	0.8716	0.3719	0.3274
Antioxidáns enzimek aktivitása										
	KAT	0.8369	0.9940	0.8191	0.8566	0.7299	0.6933	0.7526	0.9886	0.9934
	APX	0.6858	-0.3415	-0.4544	0.4586	-0.9996	-0.9557	0.7497	-0.9609	-0.1709
	GST	-0.3377	-0.4553	-0.3496	-0.5425	-0.1396	-0.2777	-0.7458	0.8190	-0.5354
	POX	0.0221	-0.0880	-0.7572	-0.7928	-0.9496	-0.6826	-0.7687	-0.2454	-0.7721
	GPOX	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	TPOX	0.5830	0.7359	-0.3098	0.4987	-0.0448	0.4999	-0.5087	0.2799	0.4741
AtGPX1 gének expressziós szintje										
	GPX1L	-0.0992	0.2177	-0.8945	-0.9809	-0.6511	-0.8156	-0.0068	-0.4195	-0.5967
	GPX1L2	0.7534	0.7553	0	-0.9748	0.3590	0.3230	-0.0861	0.3123	-0.0138
	GPX1L3	-0.2345	0.9466	0.3907	0	-0.3496	0.9991	0.6153	0.8748	0.6072
	GPX1L4	-0.2883	0.7633	-0.8445	-0.9818	0	-0.0957	-0.0042	-0.5812	-0.8653
	GPX1L5	0.5292	-0.3467	0.8665	-0.7550	-0.9814	0	-0.9343	-0.2013	0.0779
	GPX1L6	0.9666	0.9999	0.8720	-0.0216	0.4820	0.6729	0	0.9869	-0.1893
	GPX1L7	-0.9720	0.9687	0.6439	-0.2580	-0.0981	0.9500	0.2627	0	-0.1108
	GPX1L8	0.9238	-0.0201	0.0864	-0.2183	-0.9041	0.5077	-0.5819	-0.0965	0

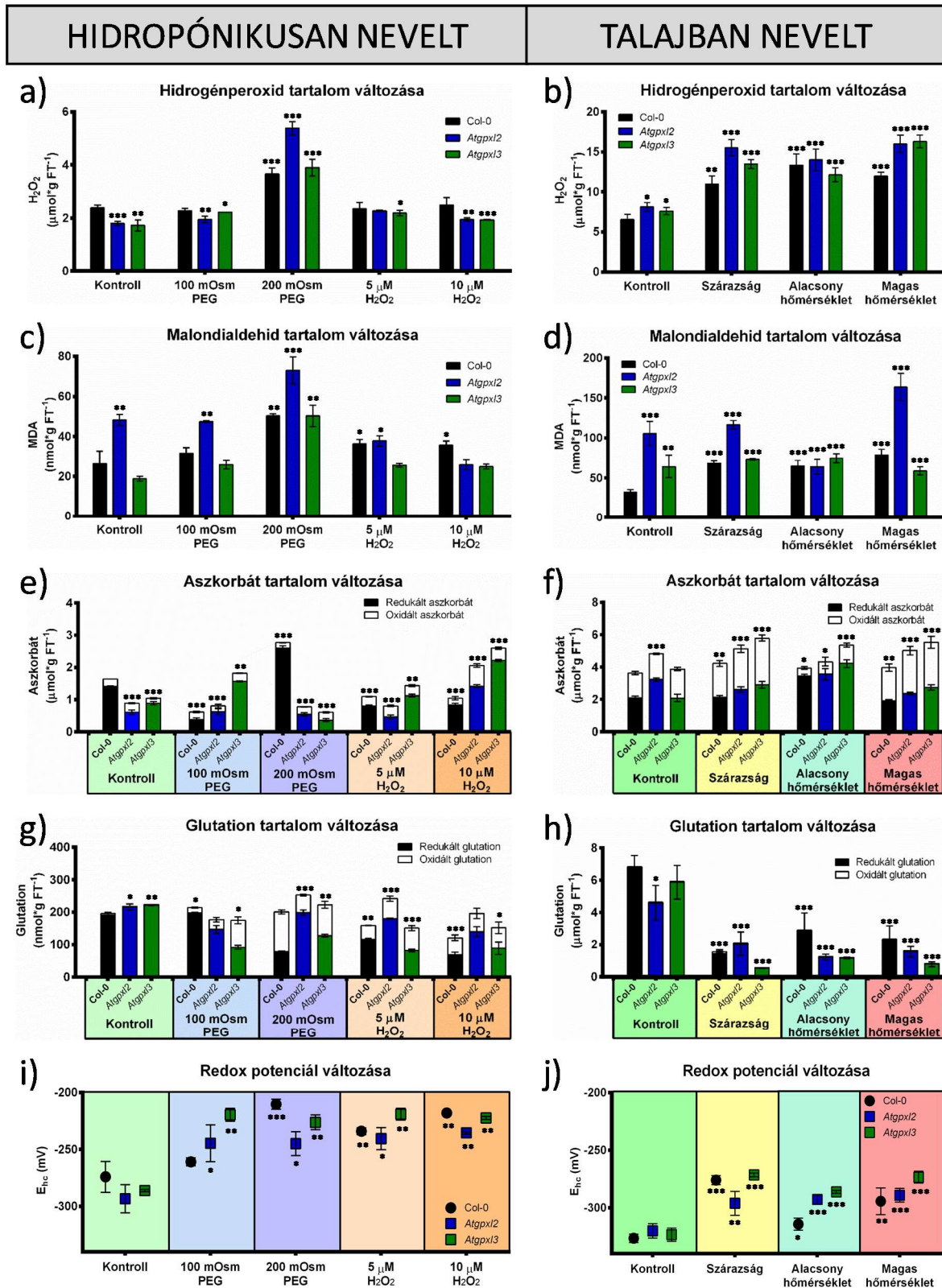
23. ábra Korrelációk a vad típusú és mutáns növények glutation függő peroxidáz aktivitása (GPOX) és a felsorolt paraméterek átlag értékei között. A kékes árnyalatok pozitív, a pirosas árnyalatok negatív korrelációkat jelölnek, a színek intenzitása a korrelációk erősségére utal, erősebb színek szorosabb korrelációkat jelölnek.

HAJTÁS										
genotípus:	Col-0	gpx1	gpx2	gpx3	gpx4	gpx5	gpx6	gpx7	gpx8	
E_{SH}	E_{hc}	-0.9482	-0.1441	-0.9806	-0.7857	-0.9344	-0.3343	-0.6111	-0.9996	0.0001
H ₂ O ₂ szint	H ₂ O ₂	0.7431	0.4625	0.8560	0.0379	0.3235	0.2387	0.7251	0.7979	0.1901
Lipid peroxidáció mértéke	MDA	0.7739	0.7204	0.8143	0.2172	0.6257	0.4942	0.9973	0.8246	0.5283
Oxidált nem enzimatisuk antioxidáns tartalom	DHA	0.4608	0.3254	0.7914	0.1034	0.5715	-0.0284	0.8362	0.8027	0.4046
	GSSG	0.4691	0.9223	0.8022	-0.9460	0.3165	0.6309	0.8829	0.6155	0.4739
Redukált nem enzimatisuk antioxidáns tartalom	ASC	0.6067	0.5508	0.8260	0.2329	0.4504	0.3325	0.7944	0.8284	0.2416
	GSH	0.8195	0.4411	0.8836	0.4844	0.8136	0.3757	0.7899	0.8698	0.0961
Transzaktivátorok expressziós szintje										
	DREB2A	0.8062	0.5911	0.9998	0.8477	0.8392	0.6367	0.9274	0.8097	-0.2894
	DREB2B	0.9244	0.8999	0.9826	0.6627	0.9979	0.8719	0.9996	0.9396	0.8375
	MYB2	0.0361	0.6525	-0.5278	0.7250	0.3017	0.6418	-0.0643	0.1168	-0.7511
	MYC2	-0.3668	0.6805	-0.3231	0.9787	-0.0706	0.3982	-0.5195	-0.2811	0.6202
ABS bioszintézis gén expressziós szintje	NCED3	0.9816	0.0671	-0.9029	-0.0905	0.1849	0.9889	-0.8654	-0.7870	0.9872
Antioxidáns enzimek aktivitása										
	KAT	0.0433	0.8957	0.2918	0.8794	0.6502	0.9709	0.1840	0.1320	0.3696
	APX	0.8911	-0.4648	-0.7062	-0.5416	0.0238	-0.2229	0.1883	-0.5348	-0.9486
	GST	0.5679	0.2678	0.9991	0.4576	0.9985	0.6932	0.9990	0.7801	0.4898
	POX	0.0251	0.6957	0.8556	0.1329	0.3557	0.2917	0.8417	0.8618	0.1935
	GPOX	0.5830	0.7359	-0.3098	0.4987	-0.0448	0.4999	-0.5087	0.2799	0.4741
	TPOX	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
AtGPX1 gének expressziós szintje										
	GPX1L	-0.7653	0.8211	-0.0257	-0.3205	0.7874	0.0580	-0.8574	-0.9889	0.5189
	GPX1L2	-0.0965	0.1121	0	-0.2770	0.9163	0.9011	0.3532	-0.6246	-0.7518
	GPX1L3	-0.9265	0.9634	-0.0337	0	0.5324	0.7247	0.3656	-0.2201	0.3874
	GPX1L4	0.6099	0.9991	0.7708	-0.3579	0	0.8143	0.9208	0.6186	0.0232
	GPX1L5	-0.3808	0.3799	-0.7431	0.1918	0.1588	0	0.1683	-0.9967	0.9148
	GPX1L6	0.3554	0.7496	0.1953	0.8558	0.8537	0.8803	0	0.1215	0.7748
	GPX1L7	-0.7576	0.9747	-0.9239	-0.9661	0.9986	0.7454	0.9643	0	0.8225
	GPX1L8	0.2276	0.6621	0.9205	0.7370	0.4673	1.0000	0.9962	0.9285	0

24. ábra Korrelációk a vad típusú és mutáns növények tioredoxin függő peroxidáz aktivitása (TPOX) és a felsorolt paraméterek átlag értékei között. A kékes árnyalatok pozitív, a pirosas árnyalatok negatív korrelációkat jelölnek, a színek intenzitása a korrelációk erősségére utal, erősebb színek szorosabb korrelációkat jelölnek.

5.3. Atgpx12 és Atgpx13 mutánsok abiotikus stresszválaszának részletesebb vizsgálata

Kiválasztva két mutánst (*Atgpx12* és *-3*), további vizsgálatokat végeztünk különböző nevelési körülmények között illetve fejlődési állapotban.



25. ábra Hidropónikusan, illetve talajban nevelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* (Col-0) és *Atgpxl2*, *Atgpxl3* inszerciós mutáns növények hajtásában mért fiziológiai paraméterei (Átlag±SE, n=6) 100 és 200 mOsm PEG, 5 és 10 μ M H_2O_2 kezelés, alacsony, magas hőmérséklet, valamint szárazság hatására. **a) b)** H_2O_2 tartalmak **c) d)** Malondialdehid tartalmak **e) f)** Aszkorbát tartalmak, redukált és oxidált formák **g) h)** Glutation tartalmak, redukált és oxidált formák **i) j)** A GSH és GSSG mennyiségekből számított fél cella redox potenciál (E_{hc}) értékek. Az adott nevelési rendszerben a kezeletlen vad típustól való szignifikáns eltérést Student-féle t-próbával állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

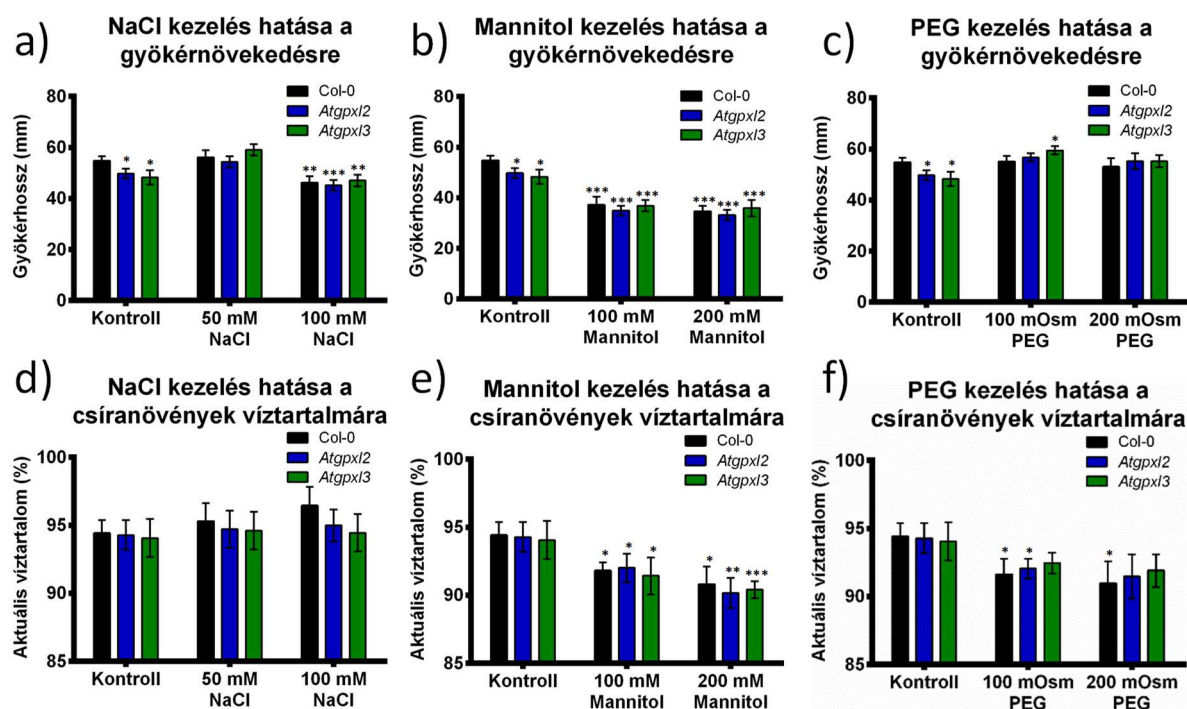
Arabidopsis thaliana vad típusú, *Atgpx12* és *Atgpx13* inszerciós mutáns növényeket hidropónikusan neveltünk 6 hétig üvegházban, az előzőektől eltérő fényviszonyok mellett. Ezt követően 2 napig kezeltük a növények egy részét 100 és 200 mOsm polietilén glikollal (PEG6000), valamint 5 és 10 μM H_2O_2 -dal. Ezen kívül hasonlóan üvegházban, de talajban nevelt növényeket tettünk ki alacsony és magas hőmérsékletnek, valamint szárazság stressznek (25. ábra).

Első lépésként ezeknél a növényeknél is a hajtások H_2O_2 és MDA tartalmát határoztuk meg (25. ábra). Hidropónikusan nevelt növények esetében mindkét mutánsban kontroll körülmények között alacsonyabb H_2O_2 , és az *Atgpx12*-ben magasabb MDA tartalmakat detektáltunk. Ezzel szemben a talajban nevelt mutáns növények hajtásában kontroll körülmények között mind a H_2O_2 , mind a MDA tartalom magasabb volt a Col-0-ban mérthez képest. Alacsonyabb koncentrációjú PEG kezelés hatására jelentős változást nem tapasztaltunk, ám 200 mOsm PEG hatására a vad típusban és a mindkét mutánsban egyaránt megemelkedtek a H_2O_2 és MDA értékek, leginkább az *Atgpx12*-ben. Ezzel ellentétben H_2O_2 kezelés hatására nem tapasztaltunk ilyen mértékű változásokat, nagyobb koncentrációval való kezelés esetén a mutánsokban inkább valamivel alacsonyabb értékeket mértünk. Szárazság, alacsony-, illetve magas hőmérsékleti stressz hatására megemelkedett a növények hajtásában a H_2O_2 tartalom, szárazság és magas hőmérséklet esetén a mutánsokban nagyobb mértékben. A MDA tartalmak azonban kicsit máshogy alakultak, a vad típusban mindhárom kezelésre hasonló mértékben emelkedett meg, *Atgpx13*-ban a kontroll állapothoz hasonló maradt, míg *Atgpx12* esetén szárazság stresszre a kontrollhoz hasonló magas értéket kaptunk: alacsony hőmérsékletre lecsökkent, míg magas hőmérsékletre megemelkedett az MDA tartalom.

Kontroll körülmények között a hidropónikusan nevelt mutáns növényekben alacsonyabb össz aszkorbát, de magasabb össz glutation tartalmakat detektáltunk, habár az *Atgpx13*-ban kisebb volt az oxidált aszkorbát forma aránya. Talajban nevelt növények esetében az *Atgpx12* mutánsban, kontroll állapotban viszont magasabb aszkorbát és alacsonyabb glutation tartalmat mértünk. PEG kezelés hatására alacsonyabb koncentrációnál a vad típusban lecsökkent, az *Atgpx13*-ban megemelkedett az aszkorbát tartalom, míg magasabb koncentrációnál ellentétesen alakult, a vad típusban megemelkedett, *Atgpx13*-ban lecsökkent. A glutation tartalmak 100 mOsm PEG kezelésre a mutáns növényekben kissé lecsökkentek, 200 mOsm PEG kezelésre viszont megemelkedtek. Ezzel párhuzamosan PEG kezelésekre jelentősen megnőtt az oxidált forma aránya mindhárom növényben. 5 μM H_2O_2 kezelésre csak az *Atgpx12* mutánsban, 10 μM -os kezelésnél viszont mindkét mutánsban megemelkedett az aszkorbát

tartalom, nagyobb koncentrációnál az oxidált forma aránya is. Az össz glutation tartalmak viszont a vad típusban és az *Atgpxl3*-ban mindkét koncentrációnál lecsökkentek, ezzel párhuzamosan az összes H₂O₂ kezelt növényben hasonló mértékben megnőtt a GSSG aránya a redukált formához képest. Szárazság és magas hőmérséklet hatására hasonló módon változtak az aszkorbát és glutation tartalmak, Col-0-ban és *Atgpxl3*-ban megemelkedett az össz aszkorbát, mindhárom növényben jelentősen megnőtt a DHA tartalom, ezzel párhuzamosan mindhárom növényben lecsökkent a glutation tartalom, legjelentősebben az *Atgpxl3*-ban. Alacsony hőmérséklet hatására viszont csak kisebb mértékben emelkedtek meg az aszkorbát tartalmak, sőt, a DHA lecsökkent. A glutation tartalmak ebben az esetben is lecsökkentek, a mutánsokban nagyobb mértékben.

A glutation tartalmakból számított fél cella redox potenciál (E_{hc}) minden kezelés hatására megemelkedett, tehát oxidáltabbá vált a redox állapotuk, hidropónikus kultúrában nevelt növényeknél a kezelések hatására nagyobb mértékben. Ez alól kivétel a vad típus, ahol kisebb koncentrációjú PEG kezelésre, valamint alacsony hőmérsékleti stresszre nem változott a redox potenciál (25. ábra).



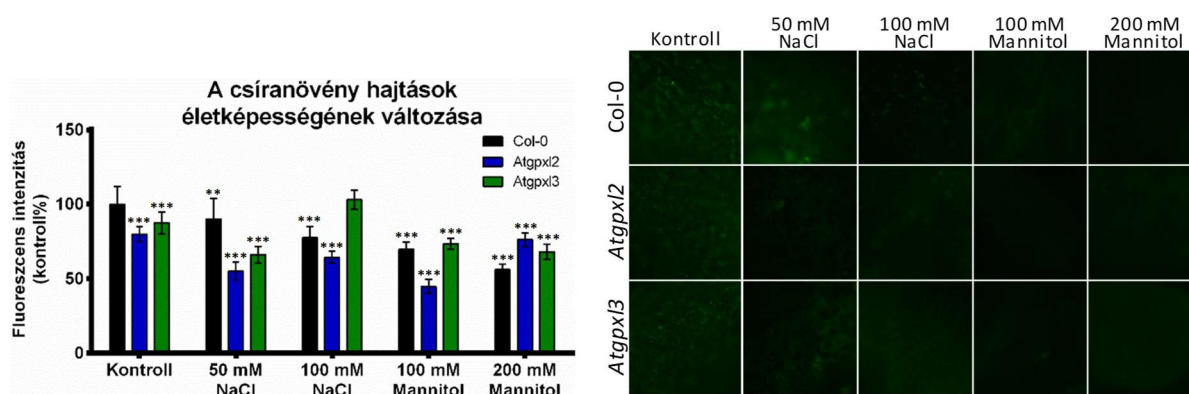
26. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *Atgpxl2*, *Atgpxl3* mutáns csíranövények gyökérhossza (a) b) c)), valamint aktuális víztartalma (d) e) f)) kontroll körülmények között, illetve 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol, vagy 100 és 200 mOsm PEG kezelés után (Átlag±SE, n=12). A kezeletlen vad típustól való szignifikáns eltérést Student-féle t-próbával állapítottuk meg (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Arabidopsis vad típusú és *Atgpxl2*, *Atgpxl3* csíranövények stressztűrésének vizsgálatához 4 napos növényeket helyeztünk különböző koncentrációjú NaCl, mannitol és PEG tartalmú

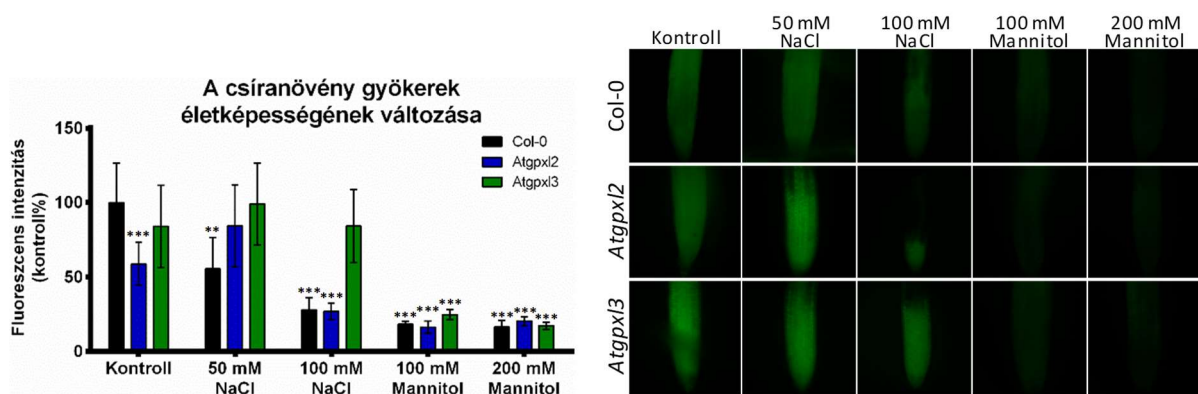
táptalajokra, majd megvizsgáltuk a gyökereik növekedését 2 hétig (26. ábra), víztartalmukat (26. ábra), és fluoreszcens festékekkel az életképességüket (27. ábra 28. ábra), valamint ROS szintjeiket (29. ábra 30. ábra 31. ábra).

Kontroll körülmények között a mutánsoknak valamivel rövidebb volt a gyökerük a Col-0-hoz képest. Alacsonyabb koncentrációjú sókezelésre, valamint PEG alkalmazásánál nem tapasztaltunk változást. Magasabb koncentrációjú só és mannitol kezelések hatására mindhárom típusú növényben hasonló mértékben csökkentek a gyökérhosszok. A 2. hét végére nem tapasztaltunk változást a növények víztartalmában sókezelés hatására. Mannitol kezelésre mindhárom típusú növényben lecsökkent az aktuális víztartalom, ám PEG kezelés hatására ez nem volt minden esetben egyértelmű, alacsonyabb PEG koncentráció hatására a vad típusban és az *Atgpxl2*-ben, míg magasabbnál csak a vad típusban csökkent le szignifikánsan a víztartalom.

FDA festék segítségével vizsgáltuk meg a hajtások és gyökerek életképességét. Ez a molekula könnyedén jut át az ép membránon, mely folyamat során a sejt aktív enzimeinek segítségével az acetát csoport lehasad, és a sejtben rekedő immáron poláros fluoreszcein detektálható. Halott vagy haldokló sejtekben azonban a membránok sérülnek, az észteráz enzimek nem működnek, a folyamat nem megy végbe, így nem kapunk jelet.



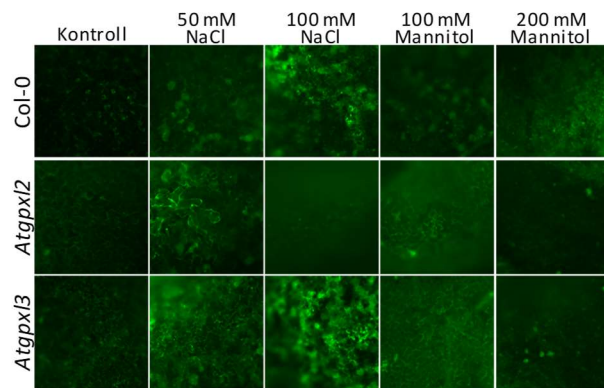
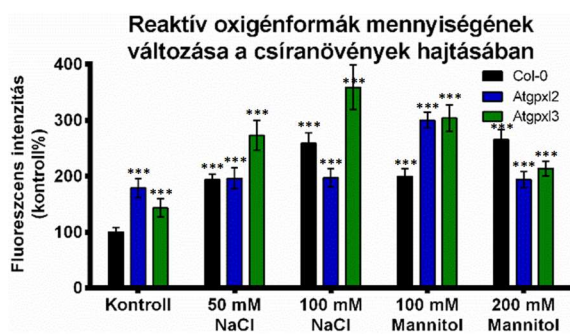
27. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns csíranövény hajtások életképességének vizsgálata fluoreszcein diacetát festék segítségével, kontroll állapotban, 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol kezelést követően. Az ábra bal oldalán a relatív fluoreszcencia intenzitások átlag értékei és szórása ($\pm$ SE, $n=12-15$) látható, a kontroll vad típus %-ában kifejezve. A kezeletlen vad típustól (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). A jobb oldalon reprezentatív mikroszkópos képek csoportja található.



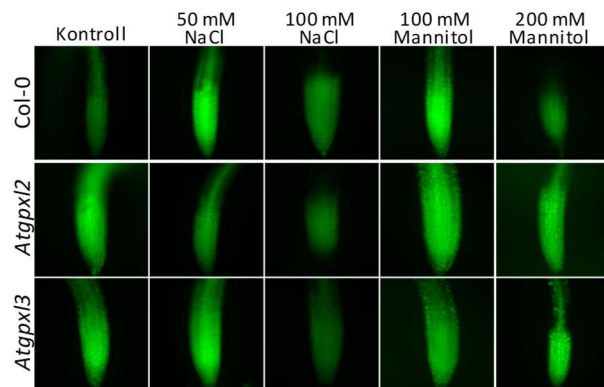
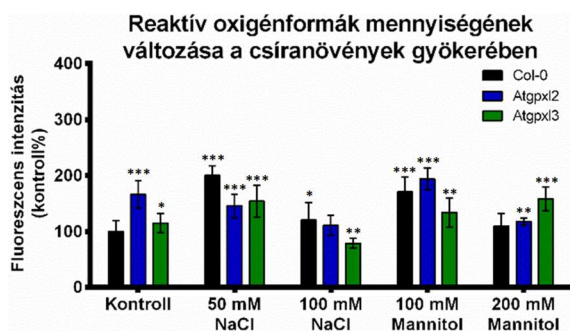
28. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns csíranövény gyökerek életképességének vizsgálata fluoreszcein diacetát festék segítségével, kontroll állapotban, 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol kezelést követően. Az ábra bal oldalán a relatív fluoreszcencia intenzitások átlag értékei és szórása ($\pm$ SE, $n=12-15$) látható, a kontroll vad típus %-ában kifejezve. Az adott nevelési rendszer kezeletlen vad típusától (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). A jobb oldalon reprezentatív mikroszkopos képek csoportja található.

Kontroll körülmények között a mutáns növények hajtásában alacsonyabb fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, mint a Col-0-nál. 50 mM sókezelésre a jelintenzitások lecsökkentek, ráadásul a mutánsokban nagyobb mértékben, 100 mM NaCl hatására a vad típusban és *Atgpxl2*-nél hasonlóan alakultak az értékek mint kisebb koncentrációnál, ám *Atgpxl3*-ban az intenzitás kontroll állapot közelében maradt. 100 és 200 mM mannitol hatására ugyanúgy lecsökkent a hajtások életképessége, kisebb koncentrációnál az *Atgpxl2*-ben valamivel alacsonyabb volt a fluoreszcencia intenzitás (27. ábra). A gyökerek esetében kontroll állapotban az *Atgpxl2* mutatott rosszabb életképességet. Kisebb koncentrációjú só hatására csak a Col-0 gyökerében, nagyobb koncentrációnál ezen kívül az *Atgpxl2* gyökerében is lecsökkent a fluoreszcencia intenzitás, vagyis a sejtek életképessége. Mannitol kezelések hatására mindhárom típusú növényben hasonló módon drasztikusan lecsökkent a gyökerek életképessége (28. ábra).

H₂DCFDA segítségével vizsgáltuk meg a csíranövény hajtások és gyökerek ROS szintjét. Hasonlóan működik, mint az előzőleg használt festék, az apoláros alap molekula könnyedén átjut az ép membránon, majd a sejtben található enzimek – észterázok segítségével – az acetát csoport lehasad, ezt követően ennek a már poláros molekulának oxidálódnia kell, hogy fluoreszcens jelet adjon. Mivel ez az oxidáció nem specifikusan egy adott reaktív szabadgyök, hanem bármelyik hatására létrejöhet, így ez az össz ROS szintre utal. A módszer hátránya lehet, hogy a fluoreszcein diacetáthoz hasonlóan itt is ép membránokra van szükség, addig képes a festék megbízhatóan detektálni, míg a membránok épek.



29. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns csíranövény hajtások össz ROS szintjének vizsgálata diklorofluorescein diacetát festék segítségével, kontroll állapotban, 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol kezelést követően. Az ábra bal oldalán a relatív fluoreszcencia intenzitások átlag értékei és szórása ($\pm$ SE, $n=12-15$) látható, a kontroll vad típus %-ában kifejezve. A kezeletlen vad típustól (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). A jobb oldalon reprezentatív mikroszkópos képek csoportja található.

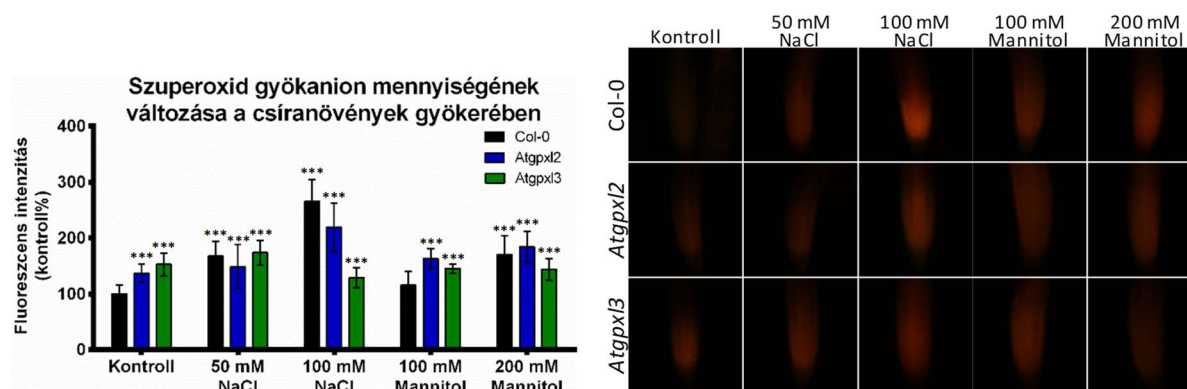


30. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns csíranövény gyökerek össz ROS szintjének vizsgálata diklorofluorescein diacetát festék segítségével, kontroll állapotban, 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol kezelést követően. Az ábra bal oldalán a relatív fluoreszcencia intenzitások átlag értékei és szórása ($\pm$ SE, $n=12-15$) látható, a kontroll vad típus %-ában kifejezve. A kezeletlen vad típustól (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). A jobb oldalon reprezentatív mikroszkópos képek csoportja található.

Kontroll állapotban a mutáns növények hajtásában és gyökerében egyaránt magasabb fluoreszcencia intenzitásokat detektáltunk. A kezelések hatására a hajtásokban megemelkedett a jelintenzitás minden növényben, sókezelések hatására az *Atgpxl3* mutánsban, 100 mM mannitol kezelésre pedig mindkét mutánsban nagyobb mértékben (**29. ábra**). A gyökerekben nem voltak ilyen nagy léptékűek a változások, alacsonyabb koncentrációjú kezelések megemelték a ROS szintet, viszont nagyobb koncentrációknál a jelintenzitások vagy nem változtak, vagy inkább csökkentek. Ez utalhat az antioxidáns védelmi rendszer hatékony működésére, de a festék hibájára is, hiszen ilyen koncentrációknál már a korábbi életképesség vizsgálatok alapján elkezdődik a sejtek károsodása (**30. ábra**).

DHE segítségével detektáltuk a gyökerekben a szuperoxid gyök szinteket. A festék könnyedén a sejtekbe jutva alaphól kék fluoreszcenciával bír. Amint azonban szuperoxid gyökkel

találkozik, oxietídium keletkezik, amely már vörös fluoreszcens jelet ad, és képes nukleinsavakkal interkalációra.

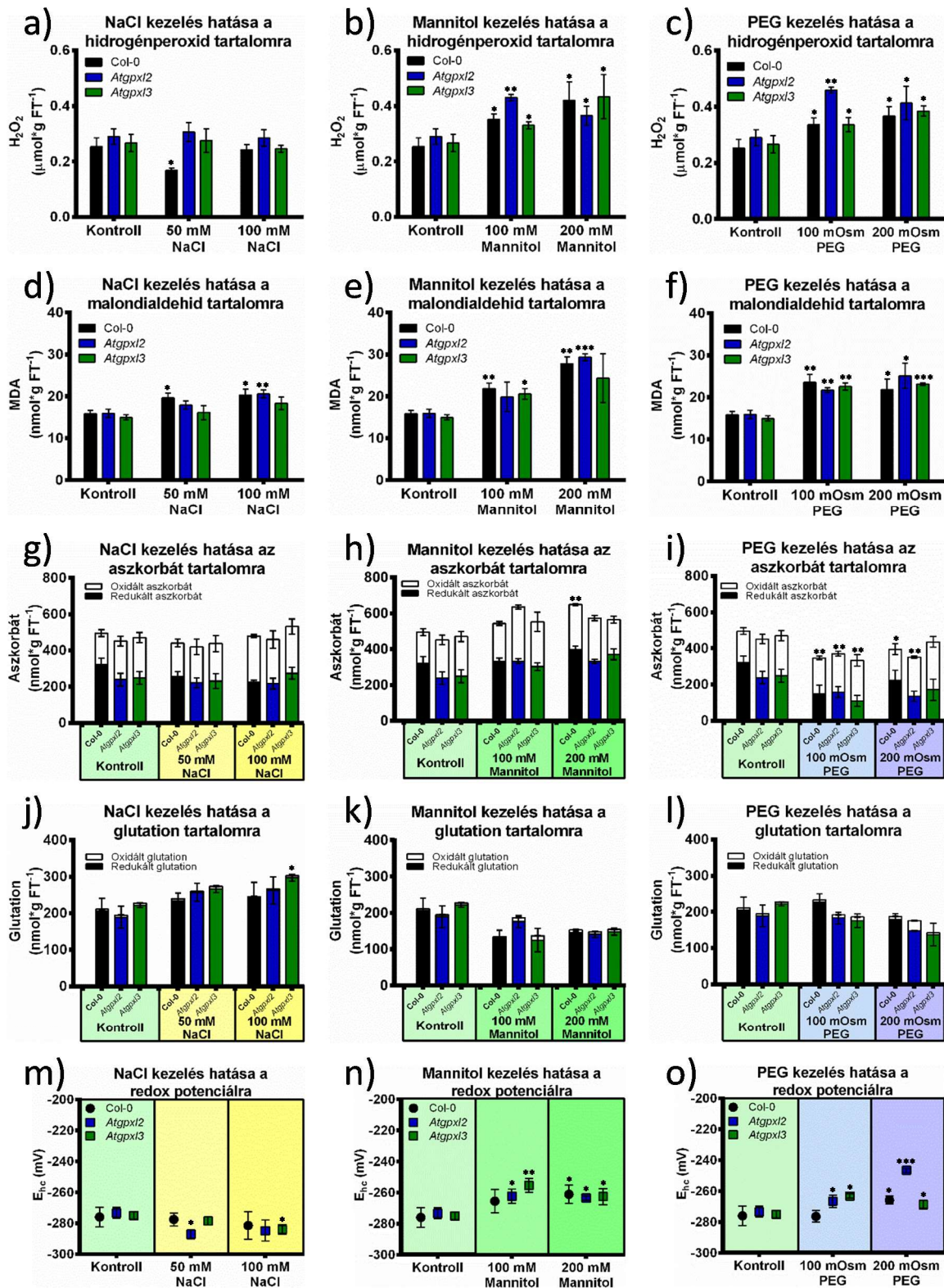


31. ábra 4+14 napos *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns csíranövény gyökerek szuperoxid gyök szintjének vizsgálata dihidroetídium festék segítségével, kontroll állapotban, 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol kezelést követően. Az ábra bal oldalán a relatív fluoreszcencia intenzitások átlag értékei és szórása ($\pm$ SE, $n=12-15$) látható, a kontroll vad típus %-ában kifejezve. A kezeletlen vad típustól (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). A jobb oldalon reprezentatív mikroszkópos képek csoportja található.

Kontroll körülmények között a mutáns növények gyökerében magasabb volt a vörös fluoreszcencia intenzitás, ami több szuperoxid gyök jelenlétére utal. Ez a magasabb érték az *Atgpxl3* mutánsban a kezelések hatására nem változott meg, *Atgpxl2*-ben is csak a 100 mM sókezelésre emelkedett kissé. A vad típusban sókezelés hatására koncentráció függően emelkedett meg a jelintenzitás, de mannitol kezelésnél csupán a nagyobb koncentrációnál detektáltunk fluoreszcencia intenzitásemelkedést, tehát szuperoxid gyök felhalmozódást (**31. ábra**).

Hasonló korú csíranövényeket vizsgáltunk a továbbiakban, a növényeket két hétig előneveltük, majd 2 napig tartó 50 és 100 mM NaCl, vagy 100 és 200 mM mannitol, vagy 100 és 200 mOsm PEG kezelést kaptak. Ezt követően meghatároztuk a csíranövények H_2O_2 és MDA tartalmát, az aszkorbát, glutation tartalmakat és redukált, oxidált formáik arányát, végül E_{hc} értékeket számítottunk GSH és GSSG mennyiségekből (**32. ábra**).

Kontroll körülmények között nem volt különbség a csíranövények H_2O_2 és a lipid peroxidáció mértékét jelző MDA tartalma között. 2 napig tartó ozmotikus stressz hatására a H_2O_2 és MDA mennyiségek a vad típusú és mutáns növényekben néhány kivételtől eltekintve hasonlóan alakultak, mannitol és PEG kezelések hatására megemelkedett a szintjük. Azonban kisebb koncentrációknál az *Atgpxl2*-ben valamivel magasabb volt a H_2O_2 tartalom a vad típusnál.



32. ábra Két hetes *Arabidopsis* Col-0 (vad típus) és *Atgpx12*, *Atgpx13* csíranövényeken mért fiziológiai paraméterek 2 napos 50 és 100 mM NaCl, 100 és 200 mM mannitol, vagy 100 és 200 mOsm PEG kezelés után (Átlag±SE, n=6). **a) b) c)** H₂O₂ tartalmak **d) e) f)** Malondialdehid tartalmak **g) h) i)** Aszkorbát tartalmak, redukált és oxidált forma **j) k) l)** Glutation tartalmak, redukált és oxidált forma **m) n) o)** A GSH és GSSG mennyiségekből számított fél cella redox potenciál (E_{hc}) értékek. A kezeletlen vad típustól (Col-0) való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Sókezelés hatására a H_2O_2 tartalom nem nagyon változott, 50 mM NaCl hatására vad típusban még kicsit le is csökkent a szintje. A MDA tartalom sókezelésre kis mértékben megemelkedett a Col-0-ban, 100 mM NaCl kezelésre az *Atgpxl2*-ben is (32. ábra).

Az össz aszkorbát tartalmak nem nagyon változtak só és mannitol kezelés hatására, csak a Col-0-ban emelkedett meg 200 mM mannitol kezelésre. Ezzel eltérően PEG kezelésre lecsökkentek az aszkorbát tartalmak, mégpedig a redukált forma csökkenése mellett a vad típusban és a mutánsokban egyaránt (32. ábra). A glutation tartalmak sem változtak szignifikánsan, kivéve 100 mM NaCl kezelést, ahol az *Atgpxl3*-ban megemelkedett. Ugyan nem szignifikánsan, de ozmotikus stressz hatására minden növényben kissé lecsökkent az össz glutation tartalom, és megemelkedett az oxidált forma aránya (32. ábra).

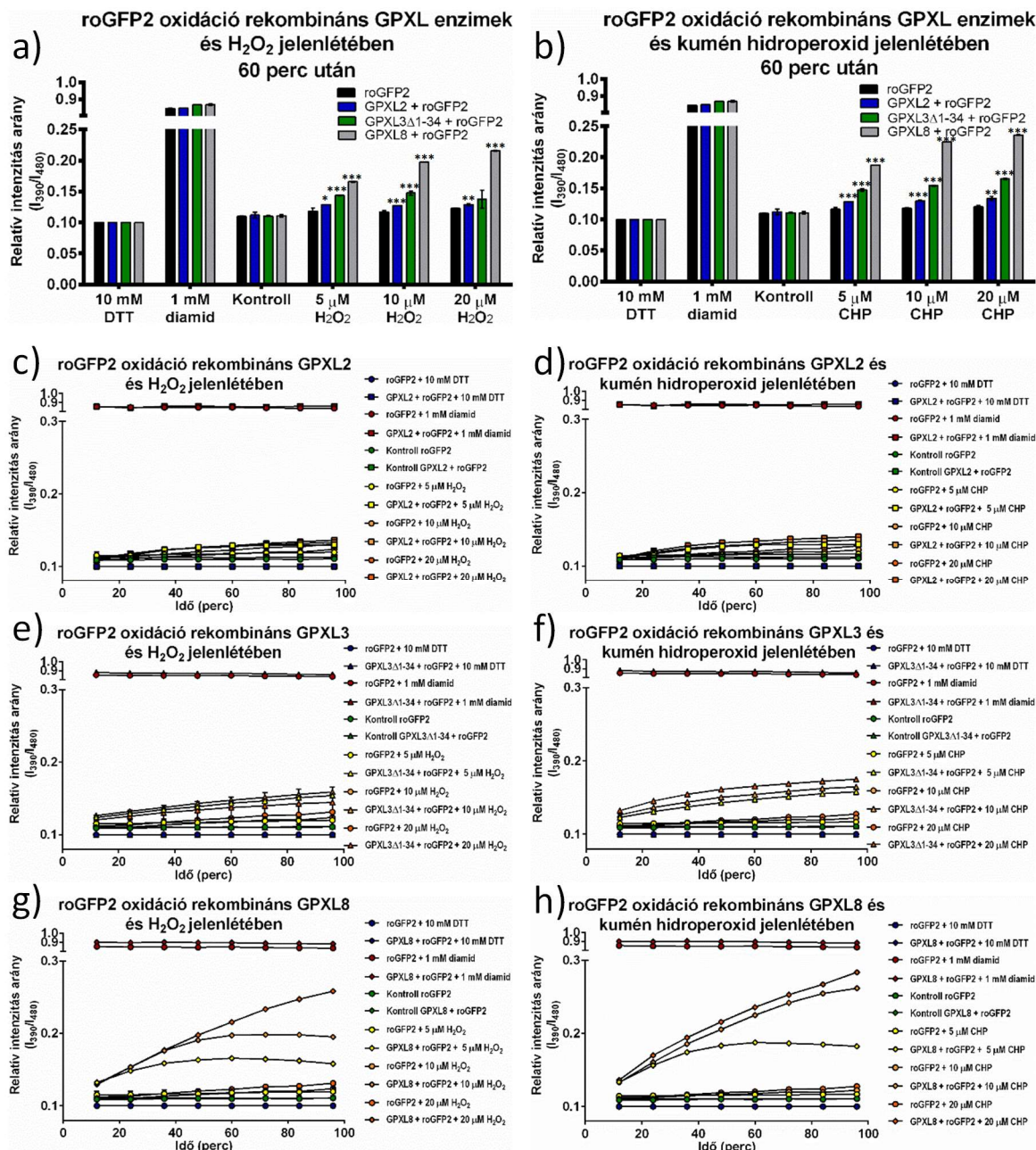
A GSSG arányának megemelkedése a számított E_{hc} értékeknél mutatkozik meg igazán, ahol kisebb koncentrációjú mannitol és PEG kezelés hatására a mutánsokban, nagyobb koncentrációknál pedig minden növényben megemelkedett a redox potenciál, oxidáltabb állapotba kerültek a növények. Legnagyobb mértékben 200 mOsm PEG kezelés hatására az *Atgpxl2* mutánsban ($-246 \pm 1,2$ mV). Sókezelésre nem volt jelentős változás, 50 mM hatására az *Atgpxl2*-ben, 100 mM-nál pedig az *Atgpxl3*-ban vált kis mértékben negatívabbá a fél cella redox potenciál (32. ábra).

5.4. Rekombináns AtGPXL enzimek jelátvivő szerepének vizsgálata

Több kutatás is arra irányul, hogy ezek a növényi GPXL fehérjék nem csupán antioxidáns enzimként funkcionálnak a sejtekben. Valószínűsíthető a stresszválasz jelátvitelében betöltött szerepük. Hogy ennek lehetőségét megvizsgáljuk rekombináns GPXL fehérjéket, valamint roGFP2-t tisztítottunk, és vizsgáltuk a roGFP2 oxidációjának sebességét különböző koncentrációjú H_2O_2 , valamint CHP oxidáló ágensek jelenlétében. Kíváncsiak voltunk, hogy különböző rekombináns GPXL fehérjék hozzáadásával változik-e a roGFP2 oxidációjának sebessége, ugyanis annak felgyorsulása utal a közvetlen elektron átadásra a GPXL fehérje és a roGFP2 szenzor fehérje között (33. ábra).

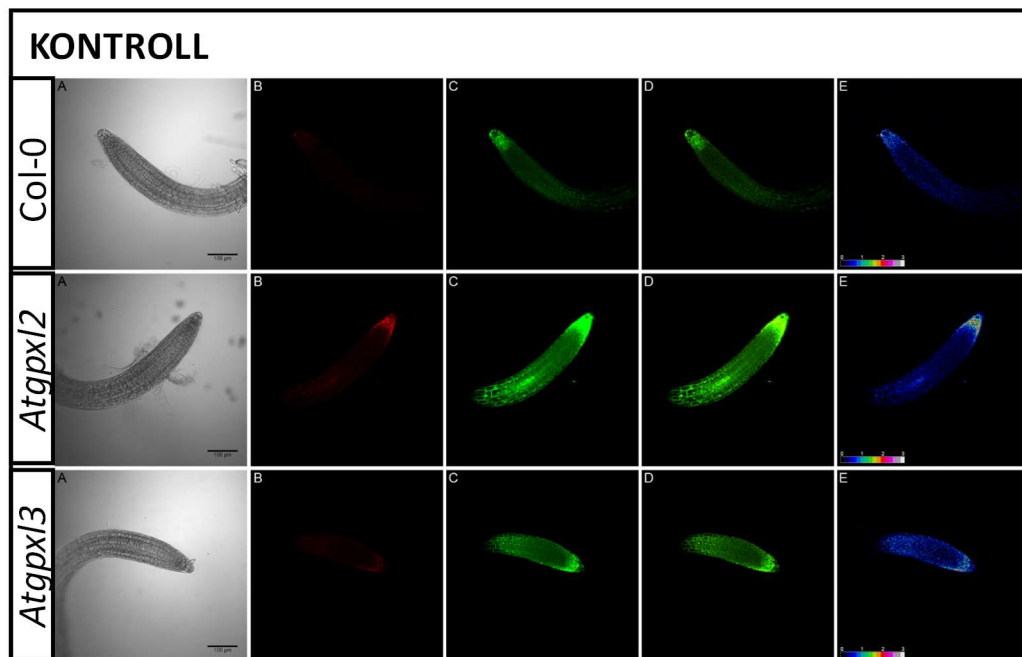
Oxidáló ágensek hozzáadása nélkül GPXL fehérjék hiányában vagy jelenlétében sem változott a roGFP2 oxidáltsága. 60 perc után 5, 10, vagy 20 μM H_2O_2 vagy CHP nem okozott szignifikáns emelkedést a szenzor fehérje két hullámhosszon gerjesztett intenzitásainak arányában ($I_{390\text{nm}}/I_{480\text{nm}}$). GPXL fehérjék jelenlétében azonban ez az arány szignifikánsan megemelkedett mindkét peroxid jelenlétében, kisebb mértékben GPXL2 és GPXL3, nagyobb mértékben GPXL8 hozzáadásával. Ezen kívül a CHP nagyobb változást okozott a roGFP2

oxidációjában GPXL8 jelenlétében. Ez az eredmény arra utal, hogy a GPXL fehérjék valóban képesek kölcsönhatni *in vitro* roGFP2-vel, annak elektront közvetlenül átadni, viszont nem egyforma hatékonysággal. Tehát legalább egyes GPXL fehérjéknek lehet szerepük jelátviteli folyamatokban.

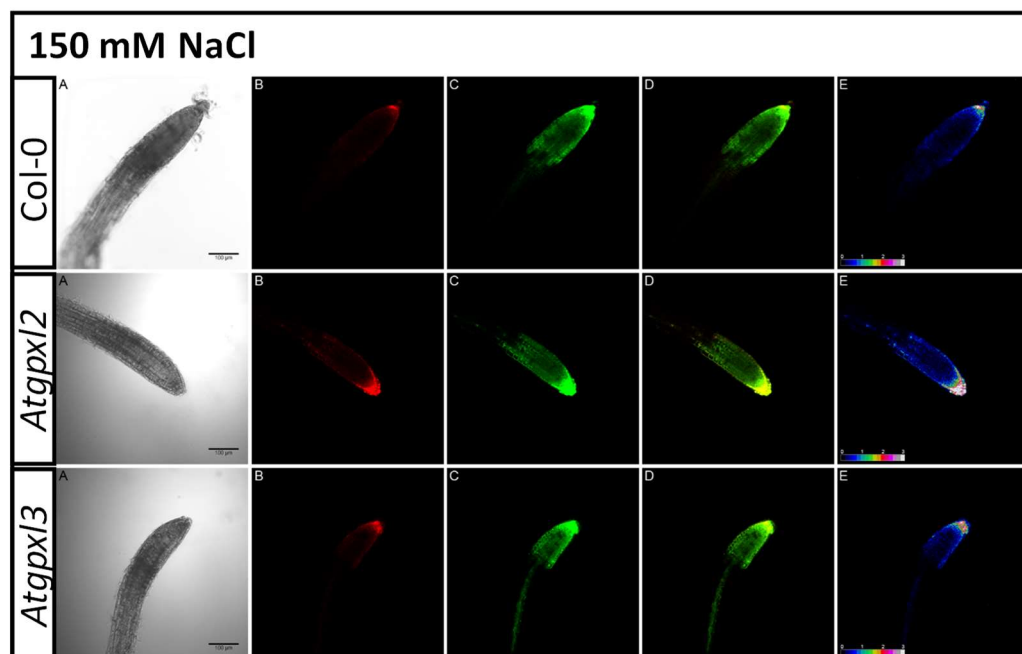


33. ábra Rekombináns GPXL2, -3 és -8 fehérjék jelátvivő képességének vizsgálata roGFP2 oxidációs sebességének detektálásával. 390 és 480 nm-en gerjesztettük a roGFP2 szenzor fehérjét, majd 500-530 nm emissziós tartományban mért intenzitások arányát (I_{390}/I_{480}) számítottuk ki. Az oxidáció során nő az intenzitás arány, az oxidált végpontot 1 mM diamid, a redukált végpontot pedig 10 mM DTT hozzáadásával határoztuk meg. Relatív intenzitás arány megadásához a redukáltsági végpontot vettük 0,1-nek. **a) b)** roGFP2 relatív intenzitás értékei különböző koncentrációjú H_2O_2 vagy CHP, illetve GPXL hiányában vagy jelenlétében 60 perc után (Átlag±SE, n=6). Az adott kezelés GPXL enzimet nem tartalmazó mintájától való szignifikáns eltérést Student-féle t-tesztel állapítottuk meg (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). **c) d)** Relatív intenzitás arányok változása az idő függvényében GPXL2 jelenlétében H_2O_2 vagy CHP hozzáadásával **e) f)** Relatív intenzitás arányok változása az idő függvényében GPXL3 jelenlétében H_2O_2 vagy CHP hozzáadásával **g) h)** Relatív intenzitás arányok változása az idő függvényében GPXL8 jelenlétében H_2O_2 vagy CHP hozzáadásával.

5.5. AtGPXL2 és -3 enzimek szerepének vizsgálata a redox állapot fenntartásában

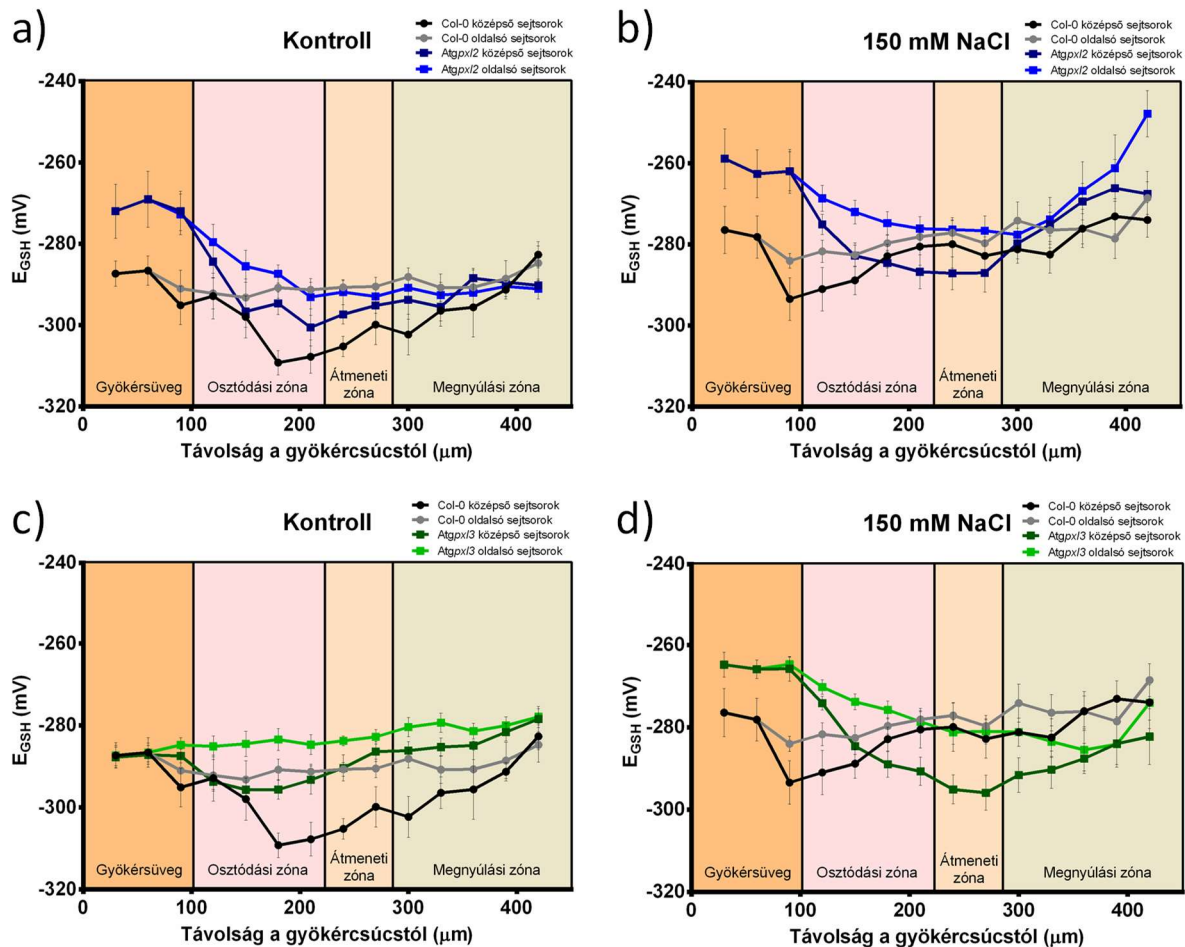


34. ábra Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek 5 napos vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* növények gyökeréről kontroll állapotban, melyek roGFP2 redox szenzor fehérjét termelnek. **A:** fénymikroszkópos képek, **B:** $\lambda_{exc}=405$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe **C:** $\lambda_{exc}=488$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe **D:** „A” és „B” képek összevonása **D:** A fluoreszcencia intenzitások arányának ábrázolása (I_{405}/I_{488}) a megadott színskála alapján. Az „A” képeken látható vonalzó 100 μ m-es.



35. ábra Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek 5 napos vad típusú (Col-0), valamint *Atgpxl2* és *Atgpxl3* növények gyökeréről 150 mM NaCl tartalmú táptalajon nevelve, melyek roGFP2 redox szenzor fehérjét termelnek. **A:** fénymikroszkópos képek, **B:** $\lambda_{exc}=405$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe **C:** $\lambda_{exc}=488$ nm-en gerjesztett, $\lambda_{em}=505-530$ nm-en detektált fluoreszcencia intenzitás képe **D:** „A” és „B” képek összevonása **D:** A fluoreszcencia intenzitások arányának ábrázolása (I_{405}/I_{488}) a megadott színskála alapján. Az „A” képeken látható vonalzó 100 μ m-es.

A GPXL enzimek redox állapot szabályozásában való lehetséges szerepének vizsgálatához, *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutánsokban kifejeztettük a redox szenzor roGFP2 fehérjét, majd ezt a Col-0 háttérű alap roGFP2-t termelő vonallal összehasonlítottuk. A roGFP2 fluoreszcens jelét konfokális mikroszkóp segítségével detektáltuk, és két különböző hullámhosszon gerjesztett ($\lambda_{exc}=405$ nm és $\lambda_{exc}=488$ nm), de azonos hullámhossz tartományban detektált ($\lambda_{em}=505-530$ nm) fluoreszcencia intenzitások segítségével Nernst egyenlet alapján számítottuk ki a szövetek glutation függő redox potenciálját (E_{GSH}).



36. ábra 5 napos kontroll **a)** *Atgpxl2* és **c)** *Atgpxl3*, valamint 150 mM NaCl tartalmú táptalajon nőtt **b)** *Atgpxl2* és **d)** *Atgpxl3* növények gyökereinek középső és külső sejt soraiiban mért redox potenciálok összehasonlítása a vad típusúval (Col-0), valamint ennek változása a gyökércsúctól távolodva (Átlag $\pm$ SE, n=10-12). Az egyes mérési pontok $\sim 30 \mu m$ átmérőjű régióról készültek. A sejtek állapota, alakja alapján meghatározva a különböző gyökérezónákat színes sávok jelzik.

A kontroll vad típusú növényeknél megállapítható, hogy a gyökércsúctól haladva az osztódási és átmeneti zónán át a megnyúlási zónáig a külső sejt sorok redox állapota közel állandó maradt, míg a középső sejt soroké negatívabbá vált az osztódási és átmeneti zónákban. Ez a tendencia megfigyelhető az *Atgpxl2* mutánsok gyökereinél is kontroll körülmények között annyi eltéréssel, hogy a gyökércsúcsnál pozitívabb redox potenciált mértünk. *Atgpxl3* mutánsok gyökerében viszont nem volt akkora a különbség a külső és belső sejt sorok redox állapotában,

mint a vad típusnál, ezen kívül kis mértékben minden sejtsorban eltolódott pozitív irányba a glutation függő redox potenciál. 150 mM sókezelés hatására mindhárom típusú növényben oxidációt tapasztaltunk, pozitívabbak voltak az E_{GSH} értékek. A vad típusú növényekben a gyökércsúcsnál és osztódási zóna elején a középső sejtsor tartotta a redukáltabb állapotot, ez a különbség a későbbi zónáknál eltűnt. Ezzel ellentétben mindkét mutánsnál az osztódási és átmeneti zónákban mutatott nagy különbséget a belső és külső sejtsorok redukáltsága, a mintázat hasonló lett a kontroll körülmények között nevelt Col-0 gyökeréhez, annál azonban oxidáltabb értékekkel, viszont a gyökércsúcsokban jóval magasabb glutation függő redox potenciálokat mértünk.

6. Eredmények értékelése

6.1. A rekombináns AtGPXL2, AtGPXL3 és AtGPXL8 fehérjék a különböző peroxidok bontásánál előnyben részesítik a tioredoxin elektron donort

A GPX-eket elsőként, mint H_2O_2 -t bontó antioxidáns enzimeket vörösvértestekben azonosították, melyek a reakcióhoz az elektront GSH-val való kölcsönhatásból nyerik (Mills, 1957). Később ez annyiban módosult, hogy egyes izoenzimek képesek a szerves hidroperoxidok lebontására is, mely aktivitás alapján elkülönítették a PHGPX enzimeket (Maiorino és mtsai., 1990).

Irodalmi adatok alapján a növényekben található glutation peroxidázok működése és jelentősége ellentmondásos. Herbette és mtsai. (2002) rekombináns napraforgó és paradicsom GPXL-eken végzett kísérletei alapján az enzimek GSH jelenlétében alacsony aktivitást mutattak szerves hidroperoxidok felé ($v_{\max}=15,8-57,5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; $K_M=12,1-128 \text{ }\mu\text{M}$), H_2O_2 -t pedig nem is voltak képesek redukálni. Rekombináns *E. coli* TRX elektrondonor jelenlétében azonban ez az aktivitás emelkedett mind a szerves hidroperoxidok ($v_{\max}=108,7-169,5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; $K_M= 8,6-16,6 \text{ }\mu\text{M}$), mind H_2O_2 ($v_{\max}=147,1-153,8 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; $K_M= 13,7-13,9 \text{ }\mu\text{M}$) esetében (Herbette és mtsai., 2002). Hasonló eredményeket kaptak kínai kel (Jung és mtsai., 2002), nyárfa (Navrot és mtsai., 2006) és *Arabidopsis* (Iqbal és mtsai., 2006) esetén is. Mivel Jung és mtsai. (2002) valamint Iqbal és mtsai. (2006) vizsgálatai szerint a növényi GPXL-ek a TRX-t előnyben részesítik redukáló komponensként a GSH-val szemben. Az említett kísérletekben az elektron donorként használt TRX mindig rekombináns *E. coli* TRX volt, és Iqbal és mtsai.-nak (2006) nem is sikerült aktivitást detektálniuk rekombináns *Arabidopsis* TRXh2 vagy TRXh3 használatával egyik peroxid szubsztrát alkalmazása esetén sem (Jung és mtsai., 2002; Iqbal és mtsai., 2006).

Kísérleteinkben azonban a heterológ rendszerben termeltetett három, általunk vizsgált *Arabidopsis* GPXL fehérje képes volt mindhárom peroxid szubsztrát (H_2O_2 , CHP és TBH) bontására *Arabidopsis* TRXh2 vagy TRXh3 redukáló szubsztrát jelenlétében is. A TRXh9 vagy GSH elektron donorként történő használatával kb. tízed akkora aktivitást kaptunk. Ez az eredmény arra utal, hogy az általunk vizsgált GPXL enzimek a TRX-okat részesítik előnyben, azonban preferenciájuk van bizonyos TRX-ok felé.

A GPXL8-cal végzett további kísérletek során az Iqbal és mtsai. (2006) által közöltekkel összevethető értékeket kaptunk. H_2O_2 szubsztrát felé a $v_{\max}=432,2 (502) \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$;

$K_M = 316,2$ (377,9) μM , míg CHP felé $v_{max} = 415$ (482,39) $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; $K_M = 183,2$ (237,8) μM . Ezek az értékek arra utalnak, hogy a GPXL8 mind a H_2O_2 -t, mind a szerves hidroperoxidot elfogadja szubsztrátnak, azonban az alacsonyabb K_M érték alapján a CHP felé nagyobb az affinitása *in vitro* kísérletben. Ezek alapján feltételezhető, hogy a GPXL-ek szerepe növényekben szerepük elsősorban a lipidperoxidok elleni védelem, és *in vivo* is a TRX-t használják elektron donorként.

6.2. Az *Atgpxl* mutánsok csökkent TPOX aktivitását más antioxidánsok képesek kompenzálni só- és ozmotikus stressz esetén

Az Arabidopsis GPXL-ek stresszválaszban betöltött szerepét inszerciós mutáns növények alkalmazásával vizsgáltuk. Passaia és mtsai. (2014) talajban nevelt 4 hetes Arabidopsis *gpxl* inszerciós mutánsok növekedését meghatározva nagyobb rozetta átmérőt mértek az *Atgpxl3* és -7 esetén a vad típushoz képest. A hidropónikusan nevelt 6 hetes növényeknél mi is hasonló tapasztaltunk, azonban kísérleteinkben az *Atgpxl1*, -2, -4 és -8 esetén is eltérés volt megfigyelhető, rozettájuk szélesebb volt, az *Atgpxl2*, és -6 mutánsoknak pedig rövidebb volt a főgyökerük. *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *gpxl* inszerciós mutáns növényeket (*Atgpxl1-8*) 2 napig tartó só- (100 mM NaCl), illetve ozmotikus (200 mOsm PEG) stressznek kitéve nem tapasztaltunk kiugróan nagy eltérést a Col-0 és a mutánsok növekedésében (17. ábra).

Az ozmotikus stressz hatását vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a Col-0 és mutáns növények H_2O_2 vagy MDA tartalmában, tehát az alkalmazott kezelések után két nappal hasonló mértékű volt a károsodás egy-egy antioxidáns GPXL enzim hiányában, mint a vad típusban. Ez az eredmény arra utal, hogy az inszerciós mutánsok valamilyen módon képesek kompenzálni egy-egy izoenzim hiányát.

A mutáns növények TPOX aktivitása kontroll körülmények között általában alacsonyabb volt a vad típusban mérthez képest, ezzel párhuzamosan azonban a GPOX aktivitásuk a vad típushoz hasonló, vagy magasabb érték volt. Ez az eredmény is arra utal közvetetten, hogy az Arabidopsis GPXL-ek a TRX redukáló szubsztrátot részesítik előnyben, illetve az antioxidáns rendszer más elemei aktiválódhattak. Ezt megerősíti, hogy több mutáns hajtásában is megemelkedett az APX aktivitás, továbbá egyes esetekben magasabb GST, GPOX aktivitás volt mérhető. Ezek az enzimek legalább részben képesek lehetnek a kiesett GPXL funkciók helyettesítésére akár a H_2O_2 (Ozyigit és mtsai., 2016), akár a szerves hidroperoxidok szintjének módosítása révén. A hajtásban és gyökérben mért adatokat összehasonlítva általánosságban

megállapítható, hogy a gyökerekben a specifikus enzimaktivitások magasabbak, mint a hajtásokban (**20. ábra, 21. ábra**).

Jelentős változásokat tapasztaltunk a főbb nem-enzimatis antioxiánsok mennyiségében is. Sókezelés hatására a gyökerekben emelkedett meg a mennyiségük, ozmotikus stressz esetén viszont a hajtások nem-enzimatis antioxiáns tartalma nőtt meg, ami fontos eltérés a két alkalmazott stresszválasz között. Az aszkorbát és a glutation az antioxiáns védelem talán legfontosabb komponensei, elsődleges funkciójuk a ROS felhalmozódás szabályozása a Foyer-Halliwell-Asada cikluson keresztül (Foyer és Noctor, 2011; Foyer és Noctor, 2013). Emellett azonban kulcsfontosságú szerepük van egyfajta összekötőként a stressz érzékelése és a bekövetkező fiziológiai válaszureakciók között (Paciolla és mtsai., 2016), szabályozzák a redox-függő jelátviteli utakat, ezáltal meghatározva a sejt sorsát (De Pinto és mtsai., 2006). A glutationnak fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában és a differenciációban is (Bashandy és mtsai., 2010; Diaz Vivancos és mtsai., 2010a). A glutation koncentrációjából, valamint a GSH és GSSG mennyiségének arányából meghatározott glutation redox potenciál érték (E_{hc} , félcella redukciós potenciál) a sejt redox potenciáljának rendkívül fontos paramétere, jól jelzi a növények állapotát, alkalmas lehet stressz markernek (Meyer és Hell, 2005; Kranner és mtsai., 2006; Potters és mtsai., 2010).

Mivel stressz hatására az inszerciós mutánsok növekedése és TPOX, GPOX aktivitása sem gátlódott jelentősen, megvizsgáltuk az *AtGPXL*-ek közötti lehetséges redundanciát is génexpressziós mintázatukat megfigyelve. A vad típusú és mutáns növények *AtGPXL* géneinek expressziós mintázatát összevetve azt tapasztaltuk, hogy sóstressz hatására a hajtásokban az *AtGPXL6* szintje emelkedett meg, míg gyökerekben jellemzően az *AtGPXL1*, -3, -7 és -8 aktiválódott. Az izoozmotikus koncentrációjú PEG kezelés hatására azonban az *AtGPXL4* és -8 indukálódott a hajtásokban, a gyökerekben pedig az *AtGPXL1* és -4 expressziós szintje emelkedett. Tehát a transzkripció alapján az egyes *AtGPXL* gének specifikusan aktiválódnak a különböző stressz hatására. Korábbi *in silico* vizsgálataink során ezen *AtGPXL* gének 5'-végi szabályozó régiójában több stressz-, illetve hormon jelátvitelhez kapcsolt szabályozó elemet találtunk (Bela és mtsai., 2015) (**4. melléklet**). Többek között MYB-kötő helyeket detektáltunk az *AtGPXL2*, -3, -5, -6, -7 és -8 esetén, ABS válasz elemeket az *AtGPXL1*, -2 és -6-nál, etilén válasz elemet az *AtGPXL1*, -4 és -6-nál, jázmonát válasz elemet pedig az *AtGPXL2*, -6, -7 és -8 promóter régió esetén. Ebből kiindulva megvizsgáltuk egyes stresszválaszban részt vevő transzkripciós faktorok (*DREB2A*, *DREB2B*, *MYB2*, *MYC2*), valamint ABS bioszintézis enzim génjének (*NCED3*) expressziós szintjét. A DREB fehérjékről

ismert, hogy kölcsönhatnak DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) cisz-ható elemekkel, így vesznek részt hideg- és szárazságstressz válaszokban (Sakuma és mtsai., 2006), továbbá a *DREB* gének expressziós szintje só- és szárazságstressz során megemelkedik (Nakashima és mtsai 2000). A MYB2 fehérje az ABS függő jelátvitelben vesz részt, só- és szárazságstressz válaszelemek génexpresszióját indukálja (Abe és mtsai., 2003; Dubos és mtsai., 2010), a MYC2 pedig az ABS mellett a jázmonát- és fényfüggő jelátviteli utak fontos transzkripciós faktora (Yadav és mtsai., 2005). Kísérleteink során a vizsgált transzkripciós faktorok génexpressziós mintázata különböző volt a mutáns növények hajtásában és gyökerében még kontroll körülmények között is. 2 napig tartó só- és ozmotikus stresszt követően a gyökerekben jellemzően indukálódtak, míg a hajtásokban a vizsgált gének aktivációja és repressziója is megfigyelhető volt (**22. ábra**).

A kontroll körülmények között, illetve különböző kezelések esetén mért fiziológiai paraméterek közötti korrelációs vizsgálataink rámutattak arra, hogy az alkalmazott stresszre adott válasz szervspecifikus. A TPOX aktivitás erősen korrelált a H₂O₂ és MDA tartalmakkal a vad típusú növények hajtásában és gyökerében is. Általánosságban elmondható, hogy a TPOX aktivitás a legtöbb mért fiziológiai paraméterrel – a KAT aktivitás kivételével – pozitívan korrelál a vad típusú növények hajtásában, ám a gyökerekben ezt nem tapasztaltuk. Ezzel szemben a GPOX aktivitás nem mutatott korrelációt a hajtások és gyökerek H₂O₂ és MDA tartalmával. Ráadásul a GPOX és GST aktivitások közötti korreláció különbözik a hajtásban és a gyökérben, hajtásban gyenge negatív ($r = -0,3377$), míg gyökérben erős pozitív ($r = 0,9813$) értéket kaptunk. A TPOX és GST aktivitások hajtásban közepesen korrelálnak ($r = 0,5679$), viszont gyökérben egyáltalán nem ($r = 0,0085$). Mindezek a korrelációs összefüggések az *Atgpxl1-8* inszerciós mutáns növényekben eltérő mintázatot mutattak, ami jelzi, hogy az AtGPXL enzimek az antioxidáns mechanizmus fontos szereplői, és az egy-egy izoenzim hiányára adott válasz az antioxidáns védelem több komponensét érinti. (**23. ábra, 24. ábra**).

6.3. Az AtGPXL2 és AtGPXL3 izoenzimek antioxidáns funkciójuk mellett befolyásolhatják a redox állapotot több abiotikus stresszválasz esetén

Az *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns növényeket további részletesebb vizsgálatokhoz a vonatkozó szakirodalmi adatok alapján választottuk. Miao és mtsai. (2006 és 2007) eredményei szerint az *Atgpxl3* mutánsok érzékenyebbek voltak mint a vad típus szárazság-, illetve ozmotikus stresszre. További kísérleteik során élesztő kéthibrid módszer segítségével igazolták az

AtGPXL3 fehérje ABI1 és ABI2 foszfatázokkal való kölcsönhatását, ezáltal szerepét az ABS függő jelátvitelben (Miao és mtsai., 2006). Gaber (2011) szintén tanulmányozta az *Atgpxl3* mutáns növények ozmotikus stresszválaszát, összehasonlítva az *Atgpxl8* mutánssal, azonban kísérleteiben az *Atgpxl3* a vad-típushoz hasonlóan viselkedett (Gaber, 2011). Az *Atgpxl2* abiotikus stressztoleranciájáról még nem állt rendelkezésre publikált információ. Azonban korábbi *in silico* promóter régió analízisünk során kiderült, hogy auxin válaszelemek, ABS válaszelemek (ABRE), hőstresszben szerepet játszó elemek (HSE), valamint MYB kötőhelyek is megtalálhatók az *AtGPXL2* promóterén (Bela és mtsai., 2015) (**4. melléklet**). Továbbá Attacha és mtsai. (2017) lokalizációs kísérleteinek eredményei alapján az enzim a citoplazmán kívül a sejtmagban is megtalálható (**4. ábra**).

Az *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns növényeket többféle nevelési rendszerben, különböző életkorban vizsgáltuk, összehasonlítva stressztűrésüket a vad típusú növényekkel. Üvegházi körülmények között a hidropónikusan nevelt növények a korábbi beállításoknál neveltekhez képest eltérően reagáltak. *Atgpxl2* mutánsban megemelkedett a H₂O₂ tartalom PEG kezelés hatására, ezzel párhuzamosan a vad típushoz és az *Atgpxl3*-hoz képest magasabb MDA tartalmakat mértünk kontroll körülmények között és ozmotikummal való kezelés hatására is. A két kísérleti rendszerben kapott eltérő peroxid szintek oka lehet, hogy a hosszabb megvilágítás következtében nagyobb mennyiségben termelődő ROS (Becker és mtsai., 2006) jelenlétét az *Atgpxl2* növények már nem tudták kompenzálni. Azonban ozmotikus stressz hatására a nem-enzimatis antioxidánsok mennyisége is változott, oxidált formáik aránya emelkedett minden növényben, ebből kifolyólag a fél cella redox potenciál eltolódott pozitívabb irányba. Irodalmi adatok alapján a különböző abiotikus stressz hatásokra a glutation tartalomban történő változások, illetve az egyes formák arányának eltolódása a glutation redox potenciál növekedését okozza, ami a sejtek oxidáltabb állapotára utal (Borsani és mtsai., 2001; Chen és mtsai., 2004b). Kísérleteinkben hasonló változást okozott az 5 µM H₂O₂ kezelés is, azonban 2 nap után nem tapasztaltunk peroxid szint emelkedést sem a mutáns növényekben, sem a vad típusban. Mivel Yang és mtsai. (2012) eredményei alapján 2-10 µM H₂O₂ kezelés hatására indukálódnak az antioxidáns enzimek (CAT, APX, POX), melyek viszonylag rövid időn belül eliminálják a H₂O₂-t, ez magyarázhatja, hogy kísérleteinkben két nap után már csak a nem-enzimatis antioxidánsok oxidált formáinak megnövekedett mennyiségét észleltük. Talajban nevelt növények jelentősen megemelkedett H₂O₂ tartalommal reagáltak a szárazság- és hőmérsékleti stresszekre. Ebben az esetben is az *Atgpxl2* mutánsok érzékenyebbnak mutatkoztak: mind kontroll állapotban, mind pedig szárazság és magas hőmérséklet hatására

szignifikánsan magasabb MDA tartalmat detektáltunk, mint a vad típusú, vagy az *Atgpxl3* mutáns növényekben. Mivel a promóter analízis során, az *AtGPXL2* promóterében hő- és szárazság stressz válasz elemeket találtunk, ez alátámasztja, hogy fontos szerepe lehet az abiotikus stresszválaszokban.

Az *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutánsok abiotikus stressztűrésének további vizsgálatához csíranövényeket kezeltünk két hétig különböző ozmotikumokkal. Kontroll állapotban a mutáns növények főgyökere kis mértékben rövidebb volt, melyet Passaia és mtsai. (2014) is tapasztaltak 8 napos csíranövények vizsgálatánál. A kezelések gátolták a főgyökerek növekedését, és ozmotikus stressz hatására csökkent a csíranövények víztartalma, azonban nem volt különbség a vad típusú és a mutáns növények között. Ugyan növekedésükön nem volt észlelhető, de a fluoreszcenciás festéssel történő vizsgálatok során az *Atgpxl2* hajtások életképessége legtöbb esetben a kontroll érték alatt maradt mind a kezeltlen növényeknél, mind ozmotikus stressz hatására, ami nem minden esetben volt párhuzamba hozható emelkedett ROS szintekkel. Ezzel ellentétben *Atgpxl3* hajtásának életképessége többnyire a vad típushoz hasonlóan változott, viszont a ROS tartalom magasabb volt mind kontroll körülmények között, mind a kezelések hatására.

Hasonló korú csíranövények rövid ideig tartó (2 nap) ozmotikus stresszkezelésre kis mértékben emelkedett H_2O_2 és MDA tartalommal reagáltak. Ebben az esetben is, az idősebb növényekhez hasonló eredményekhez hasonlóan, az *Atgpxl2* mutánsnál az alacsonyabb koncentrációjú ozmotikumok okoztak nagyobb emelkedést a H_2O_2 tartalomban, ezzel párhuzamosan az össz aszkorbát és glutation tartalmak a vad típusban mért értékeknél valamivel magasabbak voltak. Az *Atgpxl3* mutánsnál a vad típushoz hasonlóan emelkedtek meg a peroxid tartalmak, és a nem-enzimatis antioxiidáns tartalom is csupán a nagyobb 100 mM sókezelés hatására emelkedtek meg. A számított E_{hc} értékek alapján az alkalmazott sókezelés nem, az ozmotikus stressz azonban hatott a növények redox állapotára, 200 mOsm PEG kezelés hatására az *Atgpxl2* mutánsban a GSSG koncentrációjának emelkedésével a redox potenciál a vad típusnál mérthez képest pozitívabb irányba tolódott, a növények érzékenyebbek voltak (32. ábra).

Összefoglalva, eredményeink alapján az alkalmazott abiotikus stresszkezelésekre a mutáns növények (leginkább az *Atgpxl2*) számos esetben érzékenyebben reagáltak a vad típushoz képest, egyes esetekben a számított E_{hc} értékek is eltértek, ami közvetetten utal a stresszválaszban, valamint a redox szabályozásban betöltött szerepükre.

6.4. Az AtGPXL enzimek részt vehetnek jelátviteli folyamatokban

Irodalmi adatok alapján egyes GPX enzimek bizonyítottan képesek részt venni jelátviteli folyamatokban. Az élesztőben található nem-szeleno GPX3 H_2O_2 érzékelőként és jeltovábbítóként működik. A H_2O_2 szint emelkedésével a GPX3 oxidálja a Yap1 transzkripciós faktort, melynél az oxidáció hatására kialakuló diszulfid híd szerkezetbeli változást okoz, majd a Yap1 a sejtmagba jut, ahol képes antioxidáns gének átírását aktiválni, így szabályozva a H_2O_2 homeosztázist (Delaunay és mtsai., 2000; Delaunay és mtsai., 2002; Herrero és mtsai., 2008). Emlősökben található GPX4 szeloenzim is képes jeltovábbításra, a H_2O_2 -dal való reakciója után az oxidációt képes átadni spermiumban található mitokondrium-asszociált cisztein gazdag fehérjéknek, mely folyamat a spermatozoa mitokondriális kapszulájának összeszereléséhez és stabilizálásához vezet, ezáltal segítve a spermium mozgását (Maiorino és mtsai., 2005). Tehát GPX-ek oly módon képesek jelátviteli folyamatokban részt venni az aktív centrumban található ciszteinjeik vagy szelenociszteinjeik által, hogy az oxidációs jelet olyan fehérjéknek továbbítják, melyek önmagukban nem képesek a H_2O_2 -dal való reakcióra (Luo és mtsai., 2005; Marinho és mtsai., 2014).

Miao és mtsai. (2006) eredményei szerint az AtGPXL3 is működhet H_2O_2 érzékelőként és jelátadóként az ABA és szárazságstressz folyamatokban azáltal, hogy képes kölcsönhatni ABI1 és ABI2 foszfatázokkal. Ezen kívül az AtGPXL8-ról is feltételezték jeltovábbító szerepét a sejtmagban való lokalizációja miatt (Gaber és mtsai., 2012).

Megvizsgáltuk az AtGPXL2, AtGPXL3 és AtGPXL8 rekombináns fehérjék jelátadó képességét a roGFP2 fehérjével való kölcsönhatásuk monitorozásával. A roGFP2 peroxid hozzáadásával indukált oxidációjának mértéke GPXL enzimek jelenlétében megemelkedett. GPXL2 esetén alig, GPXL3 jelenlétében már szignifikánsan, GPXL8 hozzáadásával pedig nagy mértékben fokozódott a roGFP2 oxidációjának sebessége a GPXL-t nem tartalmazó mintákkal összevetve. Ez az eredmény arra utal, hogy a GPXL fehérjék, miután oxidálódtak, az elektront képesek közvetlenül átadni a roGFP2-nek, így oxidálva azt, ezáltal növelve a reakcióelegyben annak oxidációs sebességét. A roGFP2 egy mesterséges molekula, nem lehet a GPXL-ek *in vivo* interakciós partnere, kísérletünk eredménye azonban arra utal, hogy a GPXL-ek részt vehetnek jelátviteli folyamatokban, azonban még azonosítani kell a lehetséges *in vivo* kölcsönható partnereket.

6.5. Az AtGPXL2 és AtGPXL3 enzimeknek szerepe van a sejten belüli redox állapot szabályozásában

Egyre több információ erősíti meg a glutation és tioredoxin rendszerek kapcsolatát, és szerepüket a sejten belüli redox állapot fenntartásában, mely befolyásolja a növekedést, a szervek fejlődését és regenerációját is (Marty és mtsai., 2009; Bashandy és mtsai., 2010; Lu és Holmgren, 2014). Csökkent glutation tartalmú mutáns (*root meristemless 1, rml1*) Arabidopsis növényekben egyes GPXL gének expressziója is megváltozott (Schnaubelt és mtsai., 2015). Mivel a redox állapot fontos élettani folyamatokra kihatással van, elsődleges szempont az egyensúly fenntartása az antioxidáns mechanizmusok révén. Az Arabidopsis gyökér sejtjeinek redox potenciálja régióként más mintázatot mutat, melyre hatással vannak a nevelési körülmények és környezeti faktorok is (Jiang és mtsai., 2016). Hogy megállapítsuk az AtGPXL2 vagy AtGPXL3 enzim hiányának hatását a gyökerek redox állapotára, roGFP2-t fejeztettünk ki a mutáns növényekben. Habár a roGFP2 szenzor fehérjével a glutation redox potenciál számítható ki, a AtGPXL2 és -3 fehérjék pedig a TRX redukáló szubsztrátot részesítik előnyben, de a két rendszer feltehetően kapcsolatban áll egymással. Ezt támasztják alá a korrelációs analíziseink eredményei is. Eredményeink alapján már kontroll körülmények között leginkább a középső sejt sorokban voltak eltérések a vad típushoz képest. Jellemzően a mutáns növények gyökércsúcs sejtjei oxidáltabb állapotban voltak a Col-0-val összevetve. Mindez következhet az adott sejtcsoportban a peroxidtartalom emelkedéséből, de lehetséges az is, hogy az adott GPXL hiányában egyéb, még nem feltárt jelátviteli folyamatok változnak meg.

7. Összefoglalás

Kísérleteink során az AtGPXL fehérjék biokémiai tulajdonságainak megismeréséhez heterológ rendszerben termeltetett, majd tisztított enzimeken végeztünk kísérleteket, vizsgáltuk a különböző peroxidok lebontását néhány kiválasztott redukáló szubsztrát jelenlétében. Ezen kívül rekombináns roGFP2 segítségével vizsgáltuk az AtGPXL fehérjék jelátadó képességét. Kísérleteink során összehasonlítottuk az eltérő körülmények között nevelt különböző korú vad típusú (Col-0) és mutáns növények abiotikus stresszválaszát. A továbbiakban pedig kiválasztott *Atgpxl* mutáns növényekben kifejeztetett roGFP2 redox szenzor segítségével tanulmányoztuk az egy-egy GPXL hiányának hatását a glutation redox potenciál (E_{GSH}) alakulására. Eredményeink alapján az alábbi megállapításokat tettük:

1. A rekombináns AtGPXL2, AtGPXL3 és AtGPXL8 enzimek mindegyike képes a H_2O_2 , valamint a szerves hidroperoxidok lebontására *in vitro* körülmények között. Mindhárom kiválasztott rekombináns enzim előnyben részesíti a TRX redukáló szubsztrátot a GSH-val szemben, ráadásul a TRX-ok között is különbséget tesznek, a TRXh2 és TRXh3 redukáló komponenssel magasabb, míg a TRXh9-el jóval alacsonyabb peroxidáz aktivitást detektáltunk. Az AtGPXL8 enzimkinetikai paramétereinek (K_M , v_{max}) meghatározása a már publikált eredményekhez hasonló értékeket eredményezett.
2. Kontroll körülmények között a különböző életkorban vizsgált mutáns növények H_2O_2 , vagy MDA tartalma gyakran magasabb volt a vad típusban meghatározottnál. A hidropónikusan nevelt *Atgpxl5*, -6, -7 és -8 mutáns növényekben megemelkedett H_2O_2 , az *Atgpxl2* mutánsban pedig megemelkedett MDA tartalmakat detektáltunk. Megváltozott az antioxidáns rendszer aktivitása, a mutánsok hajtásában a TPOX aktivitás lecsökkent, míg az APX megemelkedett, gyökeikben pedig a nem-enzimatis antioxiidánsok mennyisége volt több. A növények feltehetően ezzel kompenzálják egy-egy AtGPXL hiányát.
3. Abiotikus stresszkezelések hatását többféle nevelési rendszerben, különböző életkorban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egyes mutáns növények érzékenyebbek voltak a vad típushoz képest. Az *Atgpxl2* mutáns H_2O_2 tartalma jelentősen megemelkedett ozmotikus stressz hatására, az *Atgpxl3* csíranövények hajtásában pedig só- és ozmotikus stressz is a Col-0-hoz képest nagyobb mértékű össz ROS szint

emelkedést okozott. Hidropónikusan nevelt mutáns növények általában a nem-enzimatis antioxiidáns tartalom mennyiségének növelésével igyekeztek kompenzálni az ozmotikus stresszt. A hajtások, illetve gyökerek eltérő stresszválaszára a korrelációs analíziseink is rávilágítanak.

4. Az *AtGPXL* gének expressziója stressz- és szervspecifikusan változott meg só- és ozmotikus stressz hatására. 100 mM NaCl kezelés a hajtásban főleg az *AtGPXL6* és -8, gyökérben viszont az *AtGPXL1*, -3 és -8 indukcióját okozta. Ettől eltérően az izoozmotikus PEG kezelés hatására a hajtásokban az *AtGPXL4* és -8, míg a gyökerekben pedig az *AtGPXL1* és -4 aktiválódtak. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az adott *AtGPXL*-eknek specifikus szerepük lehet az ozmotikus stresszválaszban.
5. Kísérleteinkben a mutáns növényekben gyakran megváltozott a glutation tartalmakból számított E_{hc} érték, ami utal a redox állapot meghatározásában játszott szerepükre. Más megközelítéssel, roGFP2 szenzor fehérje segítségével is megvizsgálva, az *Atgpxl2* és *Atgpxl3* mutáns gyökerek egyes zónáiban eltértek az E_{GSH} értékek a vad típusétól, általában a gyökércsúcsok állapota oxidáltabb volt. A kapott eredmény megerősíti funkciójukat a redox állapot szabályozásában, amelyen keresztül a növekedést, fejlődést is befolyásolhatják. Ráadásul a rekombináns GPXL fehérjék roGFP2 oxidációs vizsgálata során arra is fény derült, hogy képesek az oxidációs jel továbbítására *in vitro*, így *in vivo* akár más fehérjékkel való kölcsönhatás révén is részt vehetnek jelátviteli folyamatokban.

8. Summary

In our experiments recombinant enzymes were used to study the biochemical properties of AtGPXL enzymes. We investigated the degradation of various peroxides in the presence of a few selected reductive substrates. In addition, we tested the signalling ability of AtGPXL proteins using recombinant roGFP2. For the assessment of the role of AtGPXL proteins in stress responses, *Atgpxl* insertion mutant plants were used. We compared the abiotic stress response of wild-type (Col-0) and mutant plants grown in different conditions. Furthermore, the roGFP2 redox sensor has been expressed in selected *Atgpxl* mutant plants to study the effect of the lack of one AtGPXL isoenzyme on the regulation of glutathione redox potential (E_{GSH}). Based on our results, we have made the following observations:

1. All the studied recombinant AtGPXL2, AtGPXL3 and AtGPXL8 enzymes are capable to convert H_2O_2 and organic hydroperoxides *in vitro*. All these selected recombinant enzymes favour the TRX reducing substrate against GSH, and also distinguish between TRXs, in the presence of TRXh2 and TRXh3 the measured peroxidase activities were much higher than with TRXh9. Determination of the enzyme kinetic parameters (K_M , v_{max}) of AtGPXL8 resulted in similar values to that already published.
2. In control conditions, H_2O_2 or MDA contents of mutant plants were often higher than that of the wild type. In the hydroponically grown *Atgpxl5*, -6, -7, and -8 plants increased H_2O_2 , in the *Atgpxl2* mutant elevated MDA contents were detected. The activity of the antioxidant system changed, mostly in the shoots of mutants the TPOX activity decreased and the APX increased, while in the roots the level of non-enzymatic antioxidants was higher. It has been supposed, that the plants this way tried to compensate the lack of AtGPXLs.
3. Investigating the effects of abiotic stresses on *Atgpxl* mutants in different ages and various growth conditions came out that some mutant plants were more sensitive compared to the wild type. The content of H_2O_2 significantly increased in *Atgpxl2* mutants after osmotic stress, while in the shoots of *Atgpxl3* seedlings salt and osmotic stresses caused elevated total ROS content. The hydroponically grown mutant plants are tend to tolerate osmotic stress by increasing the amount of non-enzymatic antioxidants. Our correlation analysis also highlights the different stress response of shoots or roots.
4. AtGPXL gene expressions were changed by salt and osmotic stresses, differently due to various treatments and in organs. 100 mM NaCl treatment caused the induction of

AtGPXL6 and -8 in the shoots, and *AtGPXL1*, -3 and -8 in the roots. By contrast, after the iso-osmotic PEG treatment, *AtGPXL4* and -8 in the shoots and *AtGPXL1* and -4 in the roots were activated. These results suggest that the given AtGPXLs may play an important role in the osmotic stress response.

5. In our experiments, the E_{hc} values, calculated from the glutathione contents, in the mutant plants have often been changed, which refers to their role in regulation of the redox state. By other approaches, the E_{GSH} values, determined by using roGFP2 sensor protein, were also different in the roots of the *Atgpxl2* and *Atgpxl3* mutants compared to the wild-type, usually the root cap and meristematic zones of the mutant roots were more oxidized. The result confirms their function in regulating the redox state, through which they can also influence on growth and development. In addition, testing the interaction of recombinant AtGPXLs with roGFP2 revealed, that they were capable of transmitting the oxidation signal *in vitro*, so might also participate in signalling processes *in vivo* through interactions with other proteins.

9. Irodalomjegyzék

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15(1): 63-78.
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP (2002) Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves. *Gene*, 283(1): 227-236.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotech*, 30(3): 161-175.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373-399.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol*, 50(1): 601-639.
- Ashraf MPJC, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci*, 166(1): 3-16.
- Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 40(8): 1281-1295.
- Avsian-Kretchmer O, Eshdat Y, Gueta-Dahan Y, Ben-Hayyim G (1999) Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta*, 209(4): 469-477.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 31.
- Bashandy T, Guillemint J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell*, 22: 376-391.
- Becker B, Holtgreffe S, Jung S, Wunrau C, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ, Backhausen JE, Scheibe R (2006) Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L.(Heynh.) plants under long-and short-day conditions. *Planta*, 224(2): 380-393.
- Bela K, Bangash SAK, Csiszár J (2017a) Plant glutathione peroxidases: Structural and functional characterization, their roles in plant development. In: *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Springer, Cham. pp. 99-111.
- Bela K, Bangash SAK, Riyazuddin R, Csiszár J (2017b). Plant glutathione peroxidases: Antioxidant enzymes in plant stress responses and tolerance. In: *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Springer, Cham pp. 113-126.
- 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.
- Bela K, Riyazuddin R, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Takács Z, Zsigmond L, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2018) Comprehensive analysis of antioxidant mechanisms in Arabidopsis glutathione peroxidase-like mutants under salt-and osmotic stress reveals organ-specific significance of the AtGPXL's activities. *Environ Exp Bot*, 150: 127-140.
- Benyó D, Horváth E, Németh E, Leviczky T, Takács K, Lehotai N, Feigl G, Kolbert Zs, Ördög A, Gallé R, Csiszár J, Szabados L, Erdei L, Gallé Á (2016). Physiological and molecular responses to

- heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of *Populus deltoides* and *P. x canadensis*. *J Plant Physiol*, 201: 62-70.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 126: 1024-1030.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, 53(372): 1367-1376.
- Bowler C, Montagu MV, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev Plant Biol*, 43(1): 83-116.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Cai J, Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*, 273(19): 11401-11404.
- Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol*, 141:446–455.
- Catalá A (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(9): 1482-1495.
- Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol*, 35: 1011–1019.
- Chang CC, Ślesak I, Jordá L, Sotnikov A, Melzer M, Misalski Z, Mullineaux PM, Parker JE, Karpińska B, Karpiński S (2009) *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiol*, 150(2): 670-683.
- Chen S, Vaghchhipawala Z, Li W, Asard H, Dickman MB (2004a) Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiol*, 135(3): 1630-1641.
- Chen KM, Gong HJ, Chen GC, Wang SM, Zhang CL (2004b) Gradual drought under field conditions influences the glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. *J. Plant Growth Regul*, 23: 20-28.
- Churin Y, Schilling S, Börner T (1999) A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett*, 459(1): 33-38.
- Ciarmiello LF, Woodrow P, Fuggi A, Pontecorvo G, Carillo P (2011) Plant genes for abiotic stress. In: *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. InTechOpen. Online elérhető: <https://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/plant-genes-for-abiotic-stress/>
- Cosio C, Vuillemin L, De Meyer M, Kevers C, Penel C, Dunand C (2009) An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. *Planta*, 229(4): 823-836.
- Cramer GR, Nowak RS (1992) Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiol Plant*, 84(4): 600-605.
- Criqui MC, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Mol Biol*, 18(3): 623-627.
- Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M, Edwards R (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab Rev*, 43(2): 266-280.

- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers Environ Sci*, 2: 53.
- De Col V, Fuchs P, Nietzel T, Elsässer M, Voon CP, Candeo A, Seeliger I, Fricker MD, Grefen C, Möller IM, Bassi A, Lim BL, Zancani M, Meyer AJ, Costa A, Wagner S, Schwarzländer M (2017) ATP sensing in living plant cells reveals tissue gradients and stress dynamics of energy physiology. *Elife*, 6.
- De Pinto MC, De Gara L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J Exp Bot*, 55(408): 2559-2569.
- De Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L (2006) Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J*, 48: 784-795.
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J*, 19(19): 5157-5166.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4): 471-481.
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot*, 109: 212-228.
- Depège N, Varenne M, Boyer N (2000) Induction of oxidative stress and GPX-like protein activation in tomato plants after mechanical stimulation. *Physiol Plant*, 110(2): 209-214.
- Diao Y, Xu H, Li G, Yu A, Yu X, Hu W, Zheng X, Li S, Wang Y, Hu Z (2014) Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. *Mol Biol Rep*, 41(8): 4919-4927.
- Diaz-Vivancos P, Dong YP, Ziegler K, Markovic J, Pallardo FV, Pellny TK, Verrier PJ, Foyer CH (2010a) Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts wholecell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J*, 64:825–838.
- Diaz-Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardo FV, Foyer CH (2010b) A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J*, 431:169–178.
- Dietz KJ (2003) Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol*, 228: 141-193.
- Dixon DP, Edwards R (2010) Glutathione Transferases. *The Arabidopsis Book*, 8: e0131.
- Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot*, 60(4): 1207-1218.
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4): 338-350.
- Dombrowski JE (2003) Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiol*, 132(4): 2098-2107.
- Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, doi: 10.1098/rspb.2008.1791.
- Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP (2008) Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol*, 50(10): 1318-26.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 15: 573-581.
- 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 EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2): 278-284.
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant*, 100: 234-240.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med*, 11(1): 81-128.
- Farmer EE, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 64: 429-450.
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1): 21-25.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17: 1866-1875.
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*, 11(4): 861-905.
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155(1): 2-18.
- Foyer CH, Noctor G (2013) Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*, 18: 2087-2090.
- Fu JY (2014) Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses. *Bot Stud*, 55(1): 7.
- Fuji H, Zhu JK (2009) An autophosphorylation site of the protein kinase SOS2 is important for salt tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2: 183-190.
- Gaber A (2011) *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 is a key enzyme in response to environmental stresses. *Arab J Biotechnol*, 14: 213-24.
- Gaber A, Ogata T, Maruta T, Yoshimura K, Tamoi M, Shigeoka S (2012) The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. *Plant Cell Physiol*, 53(9): 1596-1606.
- Gao F, Chen J, Ma T, Li H, Wang N, Li Z, Zhang Z, Zhou Y (2014) The glutathione peroxidase gene family in *Thellungiella salsuginea*: genome-wide identification, classification, and gene and protein expression analysis under stress conditions. *Int J Mol Sci*, 15(2): 3319-3335.
- Gilbert HF (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol*, 63: 69-172.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48(12): 909-930.
- Griffith OW, (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 106: 207-212.
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(18): 6838-6842.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*, 5(6): 553.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141(2): 312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.

- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 279(13): 13044-13053.
- Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, 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.
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J*, 274: 2163-2180.
- Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11): 1217-1235.
- Horváth E, Bela K, Papdi Cs, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015a) The role of Arabidopsis glutathione transferase F9 gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biol Hung*, 66: 406-418.
- Horváth E, Csiszár J, Gallé Á, Poór P, Szepesi Á, Tari I (2015b) Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. *J Plant Physiol*, 183: 54-63.
- Hossain MA, Asada K (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem*, 260(24): 12920-12926.
- Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin SM, Qian P, Xin W, Li HY, Burritt DJ, Fujita M, Tran LSP (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers Plant Sci*, 6: 420.
- Hutter DE, Till BG, Greene JJ (1997) Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Exp Cell Res*, 232(2): 435-438.
- Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 273(24): 5589-5597.
- Islam T, Manna M, Reddy MK (2015) Glutathione peroxidase of *Pennisetum glaucum* (PgGPx) is a functional Cd²⁺ dependent peroxiredoxin that enhances tolerance against salinity and drought stress. *PloS One*, 10(11): e0143344.
- Jackson C, Dench J, Moore AL, Halliwell B, Foyer CH, Hall DO (1978) Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *FEBS J*, 91(2): 339-344.
- Jamil A, Riaz S, Ashraf M, Foolad M (2011) Gene expression profiling of plants under salt stress. *Crit Rev Plant Sci*, 30: 435-458.
- Jiang K, Moe-Lange J, Hennet L, Feldman LJ (2016) Salt stress affects the redox status of Arabidopsis root meristems. *Front Plant Sci*, 7: 81.
- Jung BG, Lee KO, Lee SS, Chi YH, Jang HH, Kang SS, Lee K, Lim D, Yoon SC, Yun DJ, Inoue Y, Cho MJ, Lee SY (2002) A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *J Biol Chem*, 277(15): 12572-12578.
- Kang SG, Jeong HK, Suh HS (2004) Characterization of a new member of the glutathione peroxidase gene family in *Oryza sativa*. *Mol Cells*, 17(1): 23-28.
- Katzen F (2007) Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov*, 4: 571-589.
- Kim YJ, Jang MG, Noh HY, Lee HJ, Sukweenadhi J, Kim JH, Kim SY, Kwon WS, Yang DC (2014) Molecular characterization of two glutathione peroxidase genes of *Panax ginseng* and their expression analysis against environmental stresses. *Gene*, 535(1): 33-41.

- Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ, Jones DP (1999) Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Rad Biol Med*, 27(11-12): 1208-1218.
- Kliebenstein DJ, Dietrich RA, Martin AC, Last RL, Dangl JL (1999) LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 12(11): 1022-1026.
- Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci*, 211: 77-91.
- Koh SC, Didierjean C, Navrot N, Panjikar S, Mulliert G, Rouhier N, Jacquot JP, Aubry A, Shawkataly O, Corbier C (2007) Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol*, 370(3): 512-529.
- Kranner I, Birtic S, Anderson KM, Pritchard HW (2006) Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med*, 40:2155–2165.
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol*, 188(3): 655-673.
- Larcher W (1987) Stress bei pflanzen. *Naturwissenschaften*, 74(4): 158-167.
- Law M, Charles SA, Halliwell B, (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem J*, 210: 899-903.
- Lehotai N, Pető A, Bajkán S, Erdei L, Tari I, Kolbert, Zs (2011) In vivo and in situ visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiol Plant*, 33(6): 2199-2207.
- Li WJ, Feng H, Fan JH, Zhang RQ, Zhao NM, Liu JY (2000) Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 1493(1-2): 225-230.
- Lima-Melo Y, Carvalho FE, Martins MO, Passaia G, Sousa RH, Neto MCL, Margis-Pinheiro M, Silveira JA (2016) Mitochondrial GPX1 silencing triggers differential photosynthesis impairment in response to salinity in rice plants. *J Int Plant Bio*, 58(8): 737-748.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(8): 1391-1406.
- Livak KJ, Schmittgen TD, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.
- López-Pérez L, del Carmen Martínez-Ballesta M, Maurel C, Carvajal M (2009) Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*, 70: 492-500.
- Lu J, Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*, 66: 75-87.
- Luo D, Smith SW, Anderson BD (2005) Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J Pharm Sci*, 94(2): 304-316.
- Ma LH, Takanishi CL, Wood MJ (2007) Molecular mechanism of oxidative stress perception by the Orp1 protein. *J Biol Chem*, 282(43): 31429-31436.
- Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem*, 376: 651-660.

- Maiorino M, Gregolin C, Ursini F (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 186: 448-457.
- Maiorino M, Roveri A, Benazzi L, Bosello V, Mauri P, Toppo S, Tosatto SCE, Ursini F (2005) Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *J Biol Chem*, 280(46): 38395-38402.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J*, 275: 3959-3970.
- Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*, 2: 535-562.
- Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker MD, Wirtz M, Sweetlove LJ, Meyer Y, Meyer AJ, Reichheld JP, Hell R (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 9109-9114.
- Meyer AJ (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol*, 165(13): 1390-1403.
- Meyer AJ, Dick TP (2010) Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, 13(5): 621-650.
- Meyer AJ, Hell R (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Res*, 86: 435-457.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot*, 61(15): 4197-4220.
- Miao YC, Lv D, Wang PC, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP (2006) An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, 18(10): 2749-2766.
- Miao YC, Guo JG, Liu ET, Li K, Dai J, Wang PC, Chen J, Song CP (2007) Osmotically stress-regulated the expression of glutathione peroxidase 3 in Arabidopsis. *Chinese Science Bulletin*, 52(1), 127-130.
- Michel BE, Kaufmann MR (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*, 51(5): 914-916.
- Milla MAR., Maurer A, Huete AR, Gustafson JP (2003) Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J*, 36(5): 602-615.
- Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 229(1): 189-197.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7(9): 405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9(10): 490-498.
- Molnár Á, Feigl G, Trifán V, Ördög A, Szöllösi R, Erdei L, Kolbert Zs (2018) The intensity of tyrosine nitration is associated with selenite and selenate toxicity in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicol Environ Saf*, 147: 93-101.
- Morgan B, Schwarzländer M (2016) Fluoreszierende Proteinsensoren für die Redoxregulation in lebenden Zellen. *BIOspektrum*, 22(3): 260-263.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, 25(2): 239-250.

- Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration-and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42: 657-665.
- Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol*, 142: 1364-1379.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Biol*, 49(1): 249-279.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ*, 35:454-484.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol*, 164(4): 1636-1648.
- Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Ozturk MX, Anjum NA (2016) Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Front Plant Sci* 7: 301.
- Paciolla C, Paradiso A, de Pinto M (2016) Cellular Redox Homeostasis as Central Modulator in Plant Stress Response. In: *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*. Springer, pp. 1-23.
- Palmer HJ, Paulson KE (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrition Reviews*, 55(10): 353-361.
- Papdi C, Abraham E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol*, 147: 528-542.
- Passaia G, Fonini LS, Caverzan A, Jardim-Messeder D, Christoff AP, Gaeta ML, de Araujo Mariath JE, Margis R, Margis-Pinheiro M (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Sci*, 208: 93-101.
- Passaia G, Margis-Pinheiro M (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Sci*, 234: 22-26.
- Passaia G, Queval G, Bai J, Margis-Pinheiro M, Foyer CH (2014) The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*, 65(5): 1403-1413.
- Pető A, Lehotai N, Feigl G, Tugyi N, Ördög A, Gémes K, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, 32(12): 1913-1923.
- Pimentel D (1997) *Techniques for reducing pesticide use: economic and environmental benefits*, Wiley, New York, USA.
- Potters G, Horemans N, Jansen MAK (2010) The cellular redox state in plant stress biology – A charging concept. *Plant Physiol Biochem*, 48(5): 292-300.
- Reig P, Shiao T, Gassert F (2013) *Aqueduct water risk framework*. Working paper. Washington DC: World Resources Institute. Online elérhető: <http://www.wri.org/publication/aqueduct-water-risk-framework>
- Ren B, Huang W, Åkesson B, Ladenstein R (1997) The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* 268(5): 869-885.

- Rennenberg H (2001) Glutathione: an ancient metabolite with modern tasks. In: Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht pp: 1–11.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012) Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Lipid peroxidation. InTechOpen. Online elérhető: <https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>
- Rocher C, Lalanne JL, Chaudiere J (1992) Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. FEBS J, 205(3): 955-960.
- Roeckel-Drevet P, Gagne G, Labrouhe D, Tourvieille D, Dufaure JP, Nicolas P, Drevet J R (1998) Molecular characterization, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase-encoding mRNAs in sunflower (*Helianthus annuus*). Physiol Plant, 103(3): 385-394.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 18822-18827.
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med, 30: 1191-1212.
- Schnaubelt D, Queval G, Dong Y, Diaz-Vivancos P, Makgopa ME, Howell G, De Simone A, Bai J, Hannah MA, Foyer CH (2015) Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ, 38: 266-279.
- Schwarzländer M, Fricker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, Meyer AJ (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. J Microscopy, 231(2): 299-316.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J Bot, 2012: 26.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot, 53(372): 1305-1319.
- Sugimoto M, Sakamoto W (1997) Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. Genes Genet Syst, 72(5): 311-316.
- Sytykiewicz H (2016) Expression patterns of genes involved in ascorbate-glutathione cycle in aphid-infested maize (*Zea mays* L.) seedlings. Int J Mol Sci, 17(3): 268.
- Szalai G, Kellős T, Galiba G, Kocsy G (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. J Plant Growth Reg, 28(1): 66-80.
- Tari I, Csiszár J, Horváth E, Poór P, Takács Z, Szepesi Á (2015) The alleviation of the adverse effects of salt stress in the tomato plant by salicylic acid shows a time- and organ-specific antioxidant response. Acta Biol Crac Ser Bot, 57: 21-30.
- Tayefi-Nasrabadi H, Dehghan G, Daeihassani B, Movafegi A, Samadi A (2011) Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. African J Biotech, 10(5): 751-763.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. Gene, 288: 129-138.
- Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC (2008) Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. Antioxid Redox Signal, 10(9): 1501-1514.

- Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta*, 1790(11): 1486-1500.
- Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini F, Maiorino M (2008) The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal*, 10(9): 1515-1526.
- Ushimaru T, Maki Y, Sano S, Koshiba K, Asada K, Tsuji H (1997) Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiol*, 38(5): 541-549.
- 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.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D, May MJ, Sung ZR (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*, 12: 97-109.
- Wang J, Zhang H, Allen RD (1999) Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol*, 40(7): 725-732.
- Wang X, Fang G, Yang J, Li Y (2017) A thioredoxin-dependent glutathione peroxidase (OsGPX5) is required for rice normal development and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol Rep*, 35(3): 333-342.
- Wilcox C, Hu JS, Olson EN (1987) Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science*, 238(4831): 1275-1278.
- Wunderlich L, Szarka A (2014) *A biokémia alapjai*. Typotex Kiadó, Budapest
- Xu XM, Lin H, Maple J, Björkblom B, Alves G, Larsen JP, Møller SG (2010) The Arabidopsis DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *J Cell Sci*, 123(10): 1644-1651.
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell*, 17: 1953-1966.
- Yang YL, Zhang YY, Lu J, Zhang H, Liu Y, Jiang Y, Shi RX (2012) Exogenous H₂O₂ increased catalase and peroxidase activities and proline content in *Nitraria tangutorum* callus. *Biol Plant*, 56(2): 330-336.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111(10): 5944-5972.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10039559

A doktori eljárás alapját képező 2db közlemény

Bela K, Riyazuddin R, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Takács Z, Zsigmond L, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2018) Comprehensive analysis of antioxidant mechanisms in Arabidopsis glutathione peroxidase-like mutants under salt- and osmotic stress reveals organ-specific significance of the AtGPXL's activities. *Environmental and Experimental Botany*, 150: 127-140. **IF: 4,369 (2017)**

Horváth E, Brunner Sz, **Bela K**, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 42(12): 1129-1140.

IF: 2,491

Referált folyóiratban megjelent közlemények

Bela K, Riyazuddin R, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Takács Z, Zsigmond L, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2018) Comprehensive analysis of antioxidant mechanisms in Arabidopsis glutathione peroxidase-like mutants under salt- and osmotic stress reveals organ-specific significance of the AtGPXL's activities. *Environmental and Experimental Botany*, 150: 127-140. **IF: 4,369 (2017)**

Poór P, Takács Z, **Bela K**, Czékus Z, Szalai G, Tari I (2017) Prolonged dark period modulates the oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in the leaves of salicylic acid-treated tomato. *Journal of Plant Physiology*, 213: 216-226. **IF: 3,121**

Attacha S, Solbach D, **Bela K**, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane-surfaces in Arabidopsis thaliana: Subcellular localization of GPXLs in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, 40: 1281-1295. **IF: 6,173**

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. *Journal of Plant Physiology*, 176: 192-201. **IF: 2,971**

Horváth E, Brunner Sz, **Bela K**, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 42(12): 1129-1140.

IF: 2,491

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 Biologica Hungarica*, 66: 406-418.

IF: 0,605

Csiszár J, Horvát E, Váry Zs, Gallé Á, **Bela K**, Brunner Sz, Tari I (2014) Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78: 15-26.

IF: 2,756

Összesített IF: 22,486

Egyéb szakmai anyagok

Könyvfejezet

Bela K, Bangash SAK, Csiszár J (2017) Plant Glutathione Peroxidases: Structural and Functional Characterization, Their Roles in Plant Development. In: Anwar HM, Mostofa MG, Vivancos PD, Burritt DJ, Fujita M, Tran LSP (szerk.) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Cham (Svájc): Springer International Publishing, pp. 99-111.

Bela K, Bangash SAK, Riyazuddin R, Csiszár J (2017) Plant Glutathione Peroxidases: Antioxidant Enzymes in Plant Stress Responses and Tolerance. In: Anwar HM, Mostofa MG, Vivancos PD, Burritt DJ, Fujita M, Tran LSP (szerk.) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Cham (Svájc): Springer International Publishing, pp. 113-126.

Csiszár J, Horváth E, **Bela K**, Gallé Á (2016) Glutathione-Related Enzyme System: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs). In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (szerk.) Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. Cham (Svájc): Springer International Publishing, pp. 137-158.

Konferencia közlemény

Csiszár J, **Bela K**, Horváth E, Hurton Á, Ködmön P, Csomor G, Ayaydin F (2016) A redox állapot jelentősége és vizsgálata növényekben. In: Rajnai Z, Fregán B, Marosné Kuna Zs (szerk.) Tanulmánykötet a 7. BBK előadásából, pp. 130-137.

Bela K, Horváth E, Kovács H, Brunner Sz, Csiszár J (2014) Investigation of the role of *Arabidopsis thaliana* glutathione peroxidases in drought, chilling and heat stress responses using insertion mutants. In: Csiszár J, Kőmives PM (szerk.) Tavaszi Szél 2014 / Spring Wind 2014 V. kötet, pp. 582-590.

Bela K, Mainé Csiszár J, Horváth E, Brunner Sz, Zsigmond L (2013) Glutathione peroxidázok ozmotikus stresszválaszban betöltött szerepének tanulmányozása *Arabidopsis thaliana* inszerciós mutánsokkal. In: Keresztes G (szerk.) Tavaszi Szél, 2013: Spring Wind 2013 1-2. kötet, pp. 350-356.

Konferencia előadás

Csiszár J, **Bela K**, Riyazuddin, Horváth E, Hurton Á, Zsigmond L, Gallé Á (2017) A növényi glutathione peroxidázok: miért fontosak? A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa. 30. August – 1. September 2017, Szeged, Hungary.

Bela K, Horváth E, Hurton Á, Riyazuddin, Csiszár J (2016) Studies on *Arabidopsis thaliana* glutathione peroxidases. Closing Conference of the Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme “Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society” (PLANTTRAIN, ID: HUSBR/1203/221/173). 23-24. May 2016, Novi Sad, Serbia.

Csiszár J, Zsigmond L, Horváth E, Hurton Á, **Bela K**, Rigó G, Szabados L (2016) Introduction of AtPPR40 gene into tomato using *Agrobacterium* transformation system. Closing Conference of the Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme “Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society” (PLANTTRAIN, ID: HUSBR/1203/221/173). 23-24. May 2016, Novi Sad, Serbia.

Horváth E, **Bela K**, Ködmön P, Csomor G, Papdi Cs, Szabados L, Csiszár J (2016) Role of *Arabidopsis thaliana* glutathione transferases in salt- and osmotic stress responses. Closing Conference of the Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme “Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society” (PLANTTRAIN, ID: HUSBR/1203/221/173). 23-24. May 2016, Novi Sad, Serbia.

Bela K (2016) The role of the plant glutathione peroxidases. Conference of the Doctoral School in Biology, 16-17. May 2016, Szeged, Hungary.

Csiszár J, **Bela K**, Horváth E, Gallé Á, Brunner Sz, Szabados L, Ayaydin F, Tari I (2015) Oxidative stress responses – The redox regulated aspect and molecular investigations. Opening Conference of the Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme “Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society” (PLANTTRAIN, ID: HUSBR/1203/221/173). 20-21. April, 2015, Szeged, Hungary.

Bela K, Horváth E, Attacha S, Bangash SAK, Kovács H, Csiszár J (2015) Növényi glutathione peroxidázok lúdfűben. Magyar Növénybiológiai Társaság, Fiatal Növénybiológusok előadássorozata, 06. February 2015, Pécs, Hungary.

Csiszár J, Brunner Sz, **Bela K**, Horváth E, Lehotai N, Feigl G, Papdi Cs, Perez I, Kovács H, Szabados L, Ayaydin F (2014) Redox homeostasis in plants – its significance, components and evaluation. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, 27-29. August 2014, Szeged, Hungary.

Bela K, Horváth E, Kovács H, Brunner Sz, Csiszár J (2014) Investigation of the role of *Arabidopsis thaliana* glutathione peroxidases in drought, chilling and heat stress responses using insertion mutants. Tavaszi Szél Konferencia 21-23. March 2014, Debrecen, Hungary.

Horváth E, Brunner Sz, **Bela K**, Csenki D, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2013) Hosszútávú szalicilsav kezelés hatásának vizsgálata lúdfű növényekben. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VII. Konferenciája, 29-31. August 2013, Debrecen, Hungary.

Bela K, Mainé Csiszár J, Horváth E, Brunner Sz, Zsigmond L (2013) Glutathione peroxidázok ozmotikus stresszválaszban betöltött szerepének tanulmányozása *Arabidopsis thaliana* inszerciós mutánsokkal. Tavaszi Szél Konferencia 31. May – 02. June 2013, Sopron, Hungary.

Konferencia poszter

Horváth E, Gallé Á, **Bela K**, Hurton Á, Holinka B, Riyazuddin, Csiszár J (2017) Can the mutation of *AtGSTU24* gene modify salt stress response? A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa. 30. August – 1. September 2017, Szeged, Hungary.

Riyazuddin, **Bela K**, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Hajnal ÁB, Csiszár J (2017) Role of *Arabidopsis* glutathione peroxidase-like 4 (GPXL4) enzyme in roots under salt stress. A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa. 30. August – 1. September 2017, Szeged, Hungary.

Bela K, Horváth E, Hurton Á, Riyazuddin, Takács Z, Bangash SAK, Csiszár J (2017) Investigation of *Arabidopsis thaliana* glutathione peroxidase-like enzymes. New Phytologist - next generation scientists, 24-26. July 2017, Norwich, United Kingdom.

Bela K, Horváth E, Hurton Á, Riyazuddin, Bangash SAK, Ayaydin F, Csiszár J (2016) Detection of the *in vivo* redox state in *Atgpx3* mutant plants using redox sensitive GFP2. FIBOK 2016, 21-22. March 2016, Gödöllő, Hungary.

- Hurton Á, Mándity Gy, Zsigmond L, Horváth E, **Bela K**, Derdák J, Rigó G, Csiszár J (2016) Introducing the *AtPPR40* gene into tomato and optimization of methods for regeneration of transformants. FIBOK 2016, 21-22. March 2016, Gödöllő, Hungary.
- Attacha S, **Bela K**, Moseler A, Aller I, Meyer AJ (2015) Subcellular localization of glutathione peroxidase-like enzymes in *Arabidopsis thaliana*. Botanikertagung 2015, 30. August – 03. September 2015, Munich, Germany.
- Bela K**, Horváth E, Kovács H, Csiszár J (2015) Importance of *Arabidopsis thaliana* glutathione peroxidases under drought and heat stresses. International Conference „Plant Abiotic Stress Tolerance III”, 29. June – 1. July 2015, Vienna, Austria.
- Csiszár J, Horváth E, **Bela K**, Brunner Sz, Lehotai N, Feigl G, Papdi Cs, Perez I, Kovács H, Szabados L, Ayaydin F, Tari I (2015) Redox homeostasis in salt treated *Arabidopsis thaliana* primed with salicylic acid. International Conference „Plant Abiotic Stress Tolerance III”, 29. June – 1. July 2015, Vienna, Austria.
- Horváth E, **Bela K**, Brunner Sz, Papdi Cs, Szabados L, Csiszár J (2015) Modulation of salt stress responses in *Arabidopsis* glutathione transferase mutants. International Conference „Plant Abiotic Stress Tolerance III”, 29. June – 1. July 2015, Vienna, Austria.
- Takács Z, Poór P, **Bela K**, Szepesi Á, Tari I (2015) Comparison of exogenous salicylic acid-induced polyamine catabolism in the presence of light or in darkness in tomato leaf. 12th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from model systems to field, 24-26. June 2015, Palazzo della Gran Guardia, Verona, Italy.
- Bela K**, Horváth E, Kovács H, Csiszár J (2014) Role of glutathione peroxidases in maintenance of redox homeostasis under drought and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, 27-29. August 2014, Szeged, Hungary.
- Horváth E, **Bela K**, Brunner Sz, Papdi Cs, Szabados L, Csiszár J (2014) Salt stress responses of *Arabidopsis* glutathione transferase mutants. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, 27-29. August 2014, Szeged, Hungary.
- Horváth E, Brunner Sz, **Bela K**, Csenki D, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2013) The influence of salicylic acid pre-treatments on the salt stress response of *Arabidopsis thaliana*. Oxidative stress and cell death in plants: Mechanisms and Implications; 26-28 June 2013, Florence, Italy.

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Bela Krisztina Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Bela K, Riyazuddin R, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Takács Z, Zsigmond L, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2018) Comprehensive analysis of antioxidant mechanisms in Arabidopsis glutathione peroxidase-like mutants under salt- and osmotic stress reveals organ-specific significance of the AtGPXL's activities. *Environmental and Experimental Botany*, 150: 127-140.

Szeged, 2018. június 14.

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán
egyetemi docens
SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

Horváth E, Brunner Sz, **Bela K**, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 42(12): 1129-1140.

Szeged, 2018. június 14.

Horváth Edit
tudományos munkatárs
MTA-SZBK Növénybiológiai Intézet

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán
egyetemi docens
SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolánnak**, hogy végigvezetett az úton alapszakos szakdolgozó koromtól kezdve mostanáig, hogy fáradtságot nem ismerve mindig támogatott és mellettem állt szakmai és emberi vonatkozásban egyaránt! Köszönöm, hogy lehetővé tette azt is, hogy befejezhessem munkámat a Növénybiológiai Tanszéken!

Köszönettel tartozom tanszékvezetőnknek, **Prof. Dr. Fehér Attilának** a pozitív hozzáállásáért még a bonyolultabb helyzetekben is, és hogy lehetővé tette munkám elvégzését a Növénybiológiai Tanszéken!

Köszönöm volt tanszékvezetőinknek, **Dr. Tari Irma Tanárnőnek**, és **Prof. Dr. Erdei László Tanár Úrnak**, hogy lehetővé tették szakdolgozóként a Tanszéken való munkámat! Külön köszönöm Tari Irma Tanárnőnek az építő szakmai tanácsait, melyek nagyban segítették cikkeink elfogadását!

Szeretném megköszönni **Dr. Horváth Editnek** és **Dr. Gallé Ágnesnek** az enzimaktivitás mérések és a molekuláris munka elsajátításában nyújtott segítségüket. Külön köszönöm a mintavételeknél nyújtott közreműködésüket is. Ezúton szeretném megköszönni **Riyazuddinnak**, **Hurton Ágnesnek**, és **Takács Zoltánnak** is a feldolgozások és mérések során nyújtott nagy segítségüket. Nélkülük ez a dolgozat nem jött volna létre!

Kiemelten köszönettel tartozom a Növénybiológiai Tanszék volt és jelenlegi laboránsainak, **Porkoláb Erzsébetnek**, **Kapásné Török Évának**, **Bécs Attiláné Etának**, **Dóri Erikának**, **Tandari Máriának** és **Meszlényi Máriának** az évek során nyújtott nagy segítségüket. Sosem felejttem a kis „Dörzsölő Brigád” jókedvét, nélkülük nem volt lehetetlen mintaszám. Külön köszönöm nem csak szakmai segítségüket, előkészületüket (Porkó „butik”-ja mindig fel volt töltve a hirtelen mérésekre), de lelki támaszukat is!

Köszönöm a **PhD szoba volt és jelenlegi lakóinak** a feledhetetlen jókedvet és a favicceket, melyek élvezetessé varázsolták még az irodai munkát is!

Köszönöm a **Növénybiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának** (kicsit hosszú lenne felsorolni) a sok segítséget, hogy mindig fordulhattam valakihez, a problémákat pedig meg lehetett oldani. Szeretek itt dolgozni a jó közösség miatt, köszönöm, hogy ezt is megtapasztalhattam!

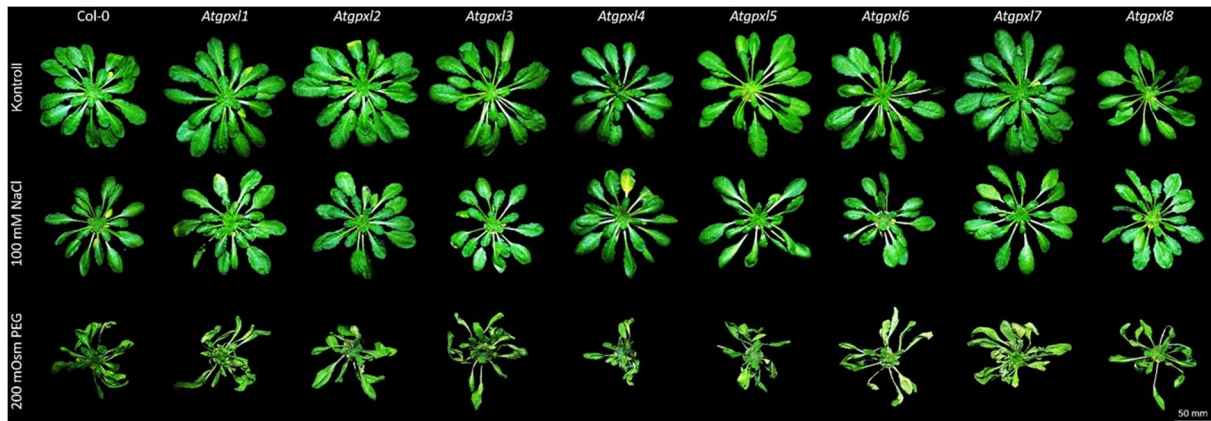
Köszönöm az **SZBK Arabidopsis Molekuláris Genetika csoport tagjainak** a sok tanácsot, segítséget új technikák elsajátításában, és hogy helyet biztosítottak növényeink neveléséhez. Szeretnék köszönetet mondani a **Cellular Imaging csoportnak** is a mikroszkópos munka elsajátításában nyújtott segítségükért, valamint az **SZTE Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak** a plate reader használatának lehetővé tételéért.

Köszönettel tartozom a **Bonni Egyetem Redox Signalling munkacsoportjának** a lehetőségeikért, hogy új módszereket tanulhattam, és hogy biztosították a feltételeket további kutatáshoz is.

Legnagyobb köszönettel pedig **családomnak**, **férjemnek**, és **barátaimnak** tartozom, akik gondoskodtak rólam, képesek voltak elviselni (ami nagy szó!), minden helyzetben mellettem álltak és támogattak! Nagyon szeretem őket!

Mellékletek

1. melléklet Hidropónikusan nevelt 6 hetes *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *Atgpxl* mutáns növények rozettája kontroll körülmények között, illetve 100 mM NaCl vagy 200 mOsm PEG kezelés után.



2. melléklet Hidropónikusan nevelt 6 hetes *Arabidopsis thaliana* vad típusú (Col-0) és *Atgpxl* mutáns növények gyökerei kontroll körülmének között, illetve 100 mM NaCl vagy 200 mOsm PEG kezelés után.



3. melléklet A kísérleteknél használt oligonukleotidok.

Gén/mutáns azonosító	Primer neve	Szekvencia	Felhasználás	Hivatkozás
At2G31570	GPXL2-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGCGGATGAATCTCCAAAGTCTA 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL2-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGAAGAGGCCTGTCCCAA 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
At2G43350	GPXL3-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGACCTCTAAGATTAATAAAATTATACTC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL3-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGCAGATGCCAATAGCTTGACGATATC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
At2G48150	GPXL4-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAGATCCGTCCATCAATTCAGT 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL4-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAGCGTCTTCAAGAGCTTTCT 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
At3G63080	GPXL5-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAATCAATCCATCAATTCACCGTCAAG 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL5-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACAATTCTTGTGCAAGGGCT 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
At4G11600	GPXL6-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCTGCTTCTCCGAACCC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL6-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCAGTAACCCCAACAACCT 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	

At1G63460	GPXL8-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGCGACGAAGGAACCAGAATC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	GPXL8-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGAGATATTCAGAAGATTCTTT 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
AT5G39950	TRXh2-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGGACCGAATCTGAGC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	TRXh2-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTATGCTCTGAGTTTGCTAAC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
AT3G08710	TRXh9-GW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAGTTTTCCGGTGGCAATGTTC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	Meyer és mtsai., nem publikált
	TRXh9-GW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAAGGCCGTTGAGGACTTTC 3'	klónozás rekombináns fehérje előállításához	
SALK_128885C	N673476-F	5' TGATAAAAAGGGAAAGGTCGTT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N673476-R	5' TTCAAGTGTTCAAAGCGAAGT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
SALK_082445C	N666554-F	5' ACTCGACACAACACGCAAAA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N666554-R	5' GCCATCAGGAGAAACCAAGA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
SALK_071176C	N671497-F	5' CAAGGCTGAGATGGGCTTTA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N671497-R	5' TGAGAAAGGCACAGCGAGAT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	

SAIL_623_F09	N826715-F	5' TGAAATGGAATGATAGGGACTTTT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N826715-R	5' AAACGAGAGAGCATGAAATGG 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
SALK_076628C	N675832-F	5' GAGATGAAGAAGGGCAAAGGT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N675832-R	5' TTGACGACGAGCAGCACT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
WiscDsLox321H10	N851190-F	5' TTCCTCGTATGTGTGTGGGTTA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N851190-R	5' TCGTAAAGAGATTTGGGTTCG 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
SALK_072007C	N658985-F	5' TCCGAGTAATGGGGTTTCAG 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N658985-R	5' TGCTTGATCTCAGGGTTTGA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
SALK_127691C	N667273-F	5' CAGTGGGATGACAACTCAAAC 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	Bela és mtsai., nem publikált
	N667273-R	5' TGGCTCTCAAACAGAACTAATCA 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	
pBIN-pROK2	SALK_LBa1	5' TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	SIGnAL
pBIN-pROK2	SALK_LBb1	5' GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	SIGnAL

pCSA110- pDAP101	SAIL-LB	5' AAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	SIGnAL
pDs-Lox	WISC-LB	5' AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC 3'	homozigóta mutáció ellenőrzése	SIGnAL
At2G25080	AtGPXLL1-F	5' AAGGTTGACGTGAATGGACC 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL1-R	5' TTGGAAAGGGGATGTGGTGG 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At2G31570	AtGPXLL2-F	5' AGAGACCAACGACACTGCAA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL2-R	5' CGCATCCGTCAGACCACATT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At2G43350	AtGPXLL3-F	5' AGCCTCTAAGTGTTGCTAACA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL3-R	5' GCAAACGGTTTCCTTGATCTCC 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At2G48150	AtGPXLL4-F	5' CCGAGAGATCCGTCCATCAAT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL4-R	5' AACCGCATTTGGAAGCAACA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At3G63080	AtGPXLL5-F	5' TCATCATCATCATCTGTGTCGGA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL5-R	5' GGA CTCCGTGAATCCGCATT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	

At4G11600	AtGPXLL6-F	5' GCTTCTTCCGAACCCAAATCTC 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL6-R	5' GTCAAGCCACATTGAGAAGCA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At4G31870	AtGPXLL7-F	5' CGTTGCGTCAAGATGTGGTT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL7-R	5' GAACCGGGTGCAAGCAAATT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At1G63460	AtGPXLL8-F	5' CCCCTTTACTTACTTGAGCATGA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Bela és mtsai., 2018
	AtGPXLL8-R	5' TCAATCCAAGTCAATGTCATGGC 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At3G18780	AtACTIN2-F	5' GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Papdi és mtsai., 2008
	AtACTIN2-R	5' AACGACCTTAATCTTCATGCTGC 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At1G16300	AtGAPDH2-F	5' AATGGAAAATTGACCGGAATGT 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Papdi és mtsai., 2008
	AtGAPDH2-R	5' CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At5G05410	AtDREB2A-F	5' TCAAACCTCGCTCAGCCAATGCTTA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Czechowski és mtsai., 2004
	AtDREB2A-R	5' TGTCTGGAGAATGGTGCGGAAGAG 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	

At3G11020	AtDREB2B-F	5' TCGAGATGAAGCGGATGCAAATCA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Czechowski és mtsai., 2004
	AtDREB2B-R	5' TGAATGAACCTGGTCCCCATCAGA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At2G47190	AtMYB2-F	5' GGCAATAGGTGGTCGAAGATTGCG 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Czechowski és mtsai., 2004
	AtMYB2-R	5' GTGTTTGGCTTGCTTTTGGACTCG 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At1G32640	AtMYC2-F	5' GATGAGGAGGTGACGGATACGGAA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Czechowski és mtsai., 2004
	AtMYC2-R	5' CGCTTTACCAGCTAATCCCGCA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	
At3G14440	AtNCED3-F	5' CGGTGGTTTACGACAAGAACAA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	Barrero és mtsai., 2006
	AtNCED3-R	5' CAGAAGCAATCTGGAGCATCAA 3'	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	

4. melléklet Az *AtGPXL* gén promóter régióinak fontosabb szabályozó elemei.

Fejlődés/ Környezeti hatás	Elnevezés	Gén	Pozíció	Szekvencia	Funkció	Hivatkozás
Általános <i>cis</i> ható elemek	5UTR Py-rich stretch	<i>AtGPXL</i> 1	163 (-)	TTTCTTCTCT	Magas transzkripció szintet biztosít	Daraselia és mtsai., 1996
		<i>AtGPXL</i> 2	1068 (+)	TTTCTTCTCT		
		<i>AtGPXL</i> 3	178 (-)	TTTCTTCTCT		
	TA-rich	<i>AtGPXL</i> 4	63, 288 (-)	TTTCTCTCTCTCTC	Pozitív szabályozó elem	
		<i>AtGPXL</i> 5	471 (+)	TTTCTTCTCT		
		<i>AtGPXL</i> 6	834 (+)	TTTCTTCTCT		
		<i>AtGPXL</i> 7	262, 276 (+)	TATATATATATATA		
Fejlődés/ Merisztéma funkció	CAT-box	<i>AtGPXL</i> 5	36 (+)	GCCACT	Merisztéma specifikus expressziót biztosít	Meshi és mtsai., 2000
		<i>AtGPXL</i> 8	386 (-)	GCCACT		
	dOCT	<i>AtGPXL</i> 6	1414 (+)	CaCGGATC	Merisztéma specifikus aktivációhoz kötött	Terada és mtsai., 1995
Mag fejlődés	AAGAA-motif	<i>AtGPXL</i> 1	1458 (+)	GAAAGAA	Mag specifikus expressziót biztosít	Bruce és mtsai., 1991
		<i>AtGPXL</i> 3	206 (-)	GAAAGAA		
		<i>AtGPXL</i> 5	119 (+)	gGTAAAGAAA		

		<i>AtGPXL</i> 6	758 (-)	GAAAGAA		
		<i>AtGPXL</i> 8	497 (-)	GAAAGAA		
	ATGCAAAT motif	<i>AtGPXL</i> 2	284 (-)	ATACAAAT	TGAGTCA motívumhoz társult szabályozó elem	
		<i>AtGPXL</i> 8	57 (-)	ATACAAAT		
	GCN4_motif	<i>AtGPXL</i> 6	1042, 1101 (+)	TGTGTCA	Endospermium specifikus expressziót biztosít	Wu és mtsai., 1998
	O2-site	<i>AtGPXL</i> 1	1414 (-)	GATGATATGG	Zein metabolizmus szabályozásában játszik szerepet	Lefèvre és mtsai., 2002
	Skn-1_motif	<i>AtGPXL</i> 2	987 (+)	GTCAT	Endospermium specifikus expressziót biztosít	Washida és mtsai., 1999
		<i>AtGPXL</i> 5	95 (-)	GTCAT		
		<i>AtGPXL</i> 6	67, 264, 299, 398, 495, 639, 1324 (-) 1024, 1074 (+)	GTCAT		
		<i>AtGPXL</i> 7	701 (-)	GTCAT		
	TATCCAT/C- motif	<i>AtGPXL</i> 1	633 (-)	TATCCAT	Szabályozó elem	Lu és mtsai., 1998
		<i>AtGPXL</i> 7	261 (-)	TATCCAT		
Hormonválasz	AuxRR-core	<i>AtGPXL</i> 7	1026 (-)	GGTCCAT	Auxin válaszban játszik szerepet	Ballas és mtsai., 1993
	TGA-box	<i>AtGPXL</i> 6	1325 (+)	TGACGTAA	Részen az auxin válaszban játszik szerepet	Lam és Lam, 1995

TGA-element	<i>AtGPXL</i> 2	681 (-), 1112 (+)	AACGAC	Auxin válasz elem	Schindler és mtsai., 1992
	<i>AtGPXL</i> 6	165, 352 (-)	AACGAC		
	<i>AtGPXL</i> 8	428 (+)	AACGAC		
CGTCA-motif	<i>AtGPXL</i> 2	972, 986 (+)	CGTCA	Metil-jázmonát válaszban játszik szerepet	Rouster és mtsai., 1997
	<i>AtGPXL</i> 6	265, 1325 (-)	CGTCA		
	<i>AtGPXL</i> 7	474 (-)	CGTCA		
	<i>AtGPXL</i> 8	158 (-), 445 (+)	CGTCA		
TGACG-motif	<i>AtGPXL</i> 2	972, 986 (-)	TGACG	Metil-jázmonát válaszban játszik szerepet	Rouster és mtsai., 1997
	<i>AtGPXL</i> 6	265, 1325 (+)	TGACG		
	<i>AtGPXL</i> 7	474 (+)	TGACG		
	<i>AtGPXL</i> 8	158 (+), 445 (-)	TGACG		
ERE	<i>AtGPXL</i> 1	138 (-)	ATTTCAAA	Etilén válasz elem	Ohme-Takagi és mtsai., 1995
	<i>AtGPXL</i> 4	15 (-)	ATTTCAAA		
	<i>AtGPXL</i> 6	992 (+)	ATTTCAAA		
GARE-motif	<i>AtGPXL</i> 8	419 (+)	AAACAGA	Gibberellin válasz elem	Sutliff és mtsai., 1993
P-box	<i>AtGPXL</i> 6	1274 (-)	CCTTTTG	Gibberellin válasz elem	Kim és mtsai., 1992

Abiotikus stressz	TCA-element	<i>AtGPXL</i> 3	179 (+)	GAGAAGAATA	Szalicilsav válaszban játszik szerepet	Goldsbrough és mtsai., 1993
		<i>AtGPXL</i> 4	166 (+)	GAGAAGAATA		
	ABRE	<i>AtGPXL</i> 2	489 (+)	TACGTG	Abszcizinsav válaszban játszik szerepet	Hobo és mtsai., 1999
		<i>AtGPXL</i> 6	1358 (+) 1381 (-) 1383 (+)	CCTACGTGGC GACACGTGGC CACGTG		
	CE1	<i>AtGPXL</i> 1	645 (+)	TGCCACCGG	ABRE elemhez társult szabályozó, abszcizinsav válaszban játszik szerepet	Shen és Ho, 1995
	ARE	<i>AtGPXL</i> 4	2 (+)	TGGTTT	Anaerob indukcióhoz kötött szabályozó elem	Walker és mtsai., 1987
		<i>AtGPXL</i> 5	229 (+)	TGGTTT		
	HSE	<i>AtGPXL</i> 1	939 (-)	AAAAAATTTC	Hőstressz válaszban játszik szerepet	Gurley és Key, 1991
		<i>AtGPXL</i> 2	733 (-)	AAAAAATTTC		
		<i>AtGPXL</i> 5	220 (-)	AAAAAATTTC		
		<i>AtGPXL</i> 6	903 (-), 987 (+)	AAAAAATTTC		
	MBS	<i>AtGPXL</i> 2	11 (+) 396 (+)	CAACTG TAACTG	MYB kötőhely, szárazság indukcióban játszik szerepet	Yamaguchi-Shinozaki és Shinoza ,1994
		<i>AtGPXL</i> 3	190 (+)	TAACTG		
		<i>AtGPXL</i> 5	77 (-)	CAACTG		

		<i>AtGPXL</i> 6	6, 601 (+) 1318 (+)	TAACTG CAACTG		
		<i>AtGPXL</i> 7	137 (+), 333 (-)	CAACTG		
		<i>AtGPXL</i> 8	413 (-)	TAACTG		
	TC-rich repeats	<i>AtGPXL</i> 1	434, 1281 (-) 548 (-)	ATTTTCTTCA GTTTCTTAC	Védekezésben és stressz válaszban szerepet játszó elem	Itzhaki és Woodson, 1993
		<i>AtGPXL</i> 2	628 (+)	ATTTTCTCCA		
		<i>AtGPXL</i> 6	116 (+) 1054, 1353, 1397 (+)	ATTTTCTTCA ATTCTCTAAC		
		<i>AtGPXL</i> 7	36 (+) 293 (+) 165 (-)	GTTTTCTTAC ATTTTCTTCA ATTTTCTCCA		
		<i>AtGPXL</i> 8	168 (-)	ATTTTCTTCA		
	WUN-motif	<i>AtGPXL</i> 7	68 (+)	TCATTACGAA	Sebzés válasz elem	Ni és mtsai., 1996
Biotikus stressz	AT-rich sequence	<i>AtGPXL</i> 1	1062 (+)	TAAAATACT	Elicitor közvetítette aktivációban játszik szerepet	Lundin és mtsai., 1994
		<i>AtGPXL</i> 2	474 (+)	TAAAATACT		
	Box-W1	<i>AtGPXL</i> 2	584 (-)	TTGACC	Gomba elicitor válasz szabályozó elem	Du és Chen, 2000
		<i>AtGPXL</i> 4	210 (-)	TTGACC		
		<i>AtGPXL</i> 5	310 (-)	TTGACC		
	EIRE	<i>AtGPXL</i> 1	1454 (-)	TTCGACC	Elicitor válasz elem	Fukuda és Shinshi, 1994

Fényválasz/ Cirkadián ritmus	ACE	<i>AtGPXL</i> 1	858 (+)	ACGTGGA	Fény válaszban játszik szerepet	Feldbrugge et al 1996
		<i>AtGPXL</i> 6	1381 (-)	ACGTGGA		
		<i>AtGPXL</i> 7	191 (-)	GACACGTATG		
		<i>AtGPXL</i> 8	37 (+)	AAAACGTTTA		
	AE-box	<i>AtGPXL</i> 1	168 (+)	AGAAACAT	Fény válasz reguláció része	Park és mtsai., 1996
		<i>AtGPXL</i> 5	7 (+)	AGAAACAA		
	AT1- motif	<i>AtGPXL</i> 8	228 (+)	ATTAATTTTACA	Fény válasz reguláció része	Datta és Cashmore, 1989
	ATC-motif	<i>AtGPXL</i> 6	1048 (+)	AATCTAATCC	Fény válasz reguláció része	
		<i>AtGPXL</i> 7	824 (-)	AGTAATCT		
	Box 4	<i>AtGPXL</i> 2	98, 637 (+)	ATTAAT	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
		<i>AtGPXL</i> 5	323 (+)	ATTAAT		
		<i>AtGPXL</i> 6	251, 686 (+)	ATTAAT		
		<i>AtGPXL</i> 8	228 (+)	ATTAAT		
	Box I	<i>AtGPXL</i> 1	138, 1266 (-)	TTTCAAA	Fény válasz elem	Block és mtsai., 1990
		<i>AtGPXL</i> 4	15 (-)	TTTCAAA		
		<i>AtGPXL</i> 6	993 (+)	TTTCAAA		

	<i>AtGPXL</i> 7	152, 977 (+)	TTTCAAA		
Box II	<i>AtGPXL</i> 6	1381 (+)	TCCACGTGGC	Fény válasz reguláció része	Block és mtsai., 1990
CATT-motif	<i>AtGPXL</i> 2	997 (+)	GCATTC	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
G-box	<i>AtGPXL</i> 1	857, 1441 (-) 1402 (-)	CACGTT CACGAC	Fény válasz reguláció része	Donald és mtsai., 1990
	<i>AtGPXL</i> 2	489 (-) 948 (-)	CACGTA CACGAC		
	<i>AtGPXL</i> 5	107, 131 (-)	CACGAC		
	<i>AtGPXL</i> 6	1360 (-) 1383 (+) 1381 (-)	CACGTT CACGTG GCCACGTGGA		
	<i>AtGPXL</i> 7	1005, 1129 (-) 782 (-), 575 (+) 796 (-)	CACGTT CACGTC TAACACGTAG		
	<i>AtGPXL</i> 8	85 (-)	CACATGG		
GA-motif	<i>AtGPXL</i> 1	577 (-)	ATAGATAA	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
	<i>AtGPXL</i> 8	24 (+)	AAAGATGA		
GAG-motif	<i>AtGPXL</i> 1	1420 (-)	AGAGATG	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
	<i>AtGPXL</i> 4	305 (+)	AGAGATG		
	<i>AtGPXL</i> 5	46, 286, 498 (+)	AGAGATG		

	<i>AtGPXL</i>	837 (-)	AGAGATG		
	6	1069 (+)	AGAGAGT		
Gap-box	<i>AtGPXL</i>	54 (-)	AAATGGAGA	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
	2				
GATA-motif	<i>AtGPXL</i>	708 (+)	AAGGATAAGG	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
	1				
	<i>AtGPXL</i>	28 (+)	GATAGGG		
	4				
	<i>AtGPXL</i>	1117 (-)	AAGGATAAGG		
	7				
GT1-motif	<i>AtGPXL</i>	862 (+)	GGTTAA	Fény válasz elem	Vauterin és mtsai., 1999
	6				
I-box	<i>AtGPXL</i>	709 (-)	ccttatcct	Fény válasz reguláció része	Donald és mtsai., 1990
	1				
	<i>AtGPXL</i>	28 (+)	GATAGGG		
	4				
	<i>AtGPXL</i>	662 (-), 1055 (+)	GATATGG		
	7	1150 (-)	TATTATCTAGA		
	<i>AtGPXL</i>	61 (+)	gGATAAGGTG		
	8	206 (+)	ATGATATGA		
TCCC-motif	<i>AtGPXL</i>	3 (-)	TCTCCCT	Fény válasz reguláció része	
	5				
	<i>AtGPXL</i>	1012, 1113 (+)	TCTCCCT		
	7				
TCT-motif	<i>AtGPXL</i>	145 (-)	TCTTAC	Fény válasz reguláció része	Argüello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996
	4				
	<i>AtGPXL</i>	337 (+)	TCTTAC		
	6				
	<i>AtGPXL</i>	40 (+), 245 (-)	TCTTAC		
	7				

as-2-box	<i>AtGPXL</i> 6	60 (+)	GATAatGATG	Fény válaszban és hajtás specifikus expresszióban játszik szerepet Fény válasz reguláció része	Lam és Chua, 1989
Chs-CMA1a	<i>AtGPXL</i> 1	1140 (-)	TTACTTAA		
	<i>AtGPXL</i> 7	68 (+)	TTACTTAA		Argüello-Astorga és Herrera- Estrella, 1996
circadian	<i>AtGPXL</i> 1	797 (+)	CAAAGATATC	Cirkadián szabályozásban játszik szerepet	Piechulla és mtsai., 1998
	<i>AtGPXL</i> 3	21 (+), 160 (-)	CAANNNNATC		
	<i>AtGPXL</i> 5	361 (-)	CAANNNNATC		
	<i>AtGPXL</i> 8	297 (-)	CAANNNNATC		
Unnamed	<i>AtGPXL</i> 1	1041 (+)	GGATTTTACAGT	Fitokróm expresszió negatív szabályozó eleme	

A mellékletek hivatkozásai:

- Argüello-Astorga GR, Herrera-Estrella LR (1996) Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiol*, 112:1151-66.
- Ballas N, Wong LM, Theologis A (1993) Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5, of pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol*, 233:580-96.
- Barrero J, Rodríguez PL, Quesada V, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL (2006) Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant Cell Environ*, 29:2000-2008.
- Bela K, Riyazuddin R, Horváth E, Hurton Á, Gallé Á, Takács Z, Zsigmond L, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2018) Comprehensive analysis of antioxidant mechanisms in Arabidopsis glutathione peroxidase-like mutants under salt-and osmotic stress reveals organ-specific significance of the AtGPXL's activities. *Environ Exp Bot*, 150:127-140.
- Block A, Dangel JL, Hahlbrock K, Schulze-Lefert P (1990) Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:5387-91.
- Bruce WB, Deng XW, Quail PH (1991) A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription. *EMBO J*, 10:3015-24.
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR, Udvardi MK (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. *Plant J*, 38:366-379.
- Daraselia ND, Tarchevskaya S, Narita JO (1996) The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. *Plant Physiol*, 112:727-33.
- Datta N, Cashmore AR (1989) Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 1:1069-77.
- Donald RG, Schindler U, Batschauer A, Cashmore AR (1990) The plant G box promoter sequence activates transcription in *Saccharomyces cerevisiae* and is bound in vitro by a yeast activity similar to GBF, the plant G box binding factor. *EMBO J*, 9:1727-35.
- Du L, Chen Z (2000) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in Arabidopsis. *Plant J*, 24:837-47.
- Feldbrugge M, Sprenger M, Hahlbrock K, Weisshaar B (1997) PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J*, 11:1079-93.
- Fukuda Y, Shinshi H (1994) Characterization of a novel cis-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol*, 24:485-93.
- Goldsbrough AP, Albrecht H, Stratford R (1993) Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *Plant J*, 3:563-71.
- Gurley WB, Key JL (1991) Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry*, 30:1-12.
- Hobo T, Asada M, Kowyama Y, Hattori T (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J*, 19:679-89.
- Itzhaki H, Woodson WR (1993) Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation. *Plant Mol Biol*, 22:43-58.
- Kim JK, Cao J, Wu R (1992) Regulation and interaction of multiple protein factors with the proximal promoter regions of a rice high pI alpha-amylase gene. *Mol Gen Genet*, 232:383-93.
- Lam E, Chua NH (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell*, 1:1147-56.
- Lam E, Lam YK (1995) Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acids Res*, 23:3778-85.

- Lefèvre A, Consoli L, Gaziola SA, Pellegrino AP, Azevedo RA, Damerval C (2002) Dissecting the Opaque-2 regulatory network using transcriptome and proteome approaches along with enzyme activity measurements. *Sci Agric*, 59:407-14.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30:325-7.
- Lu CA, Lim EK, Yu SM (1998) Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J Biol Chem*, 273:10120-31.
- Lundin M, Nehlin JO, Ronne H (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol*, 14:1979-85.
- Meshi T, Taoka KI, Iwabuchi M (2000) Regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Plant Mol Biol*, 43:643-57.
- Ni M, Cui D, Gelvin SB (1996) Sequence-specific interactions of wound-inducible nuclear factors with mannopine synthase 2' promoter wound-responsive elements. *Plant Mol Biol*, 30:77-96.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7:173-82.
- Papdi C, Abrahám E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol*, 147:528-542.
- Park SC, Kwon HB, Shih MC (1996) Cis-acting elements essential for light regulation of the nuclear gene encoding the A subunit of chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, 112:1563-71.
- Piechulla B, Merforth N, Rudolph B (1998) Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol*, 38:655-62.
- Rombauts S, Déhais P, Van Montagu M, Rouzé P (1999) PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res*, 27:295-6.
- Rouster J, Leah R, Mundy J, Cameron-Mills V (1997) Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J*, 11:513-23.
- Schindler U, Terzaghi W, Beckmann H, Kadesch T, Cashmore AR (1992) DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the Arabidopsis transcription factor GBF1. *EMBO J*, 11:1275-89.
- Shen Q, Ho TH (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell*, 7:295-307.
- Sutliff TD, Lanahan MB, Ho TH (1993) Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley alpha-amylase promoter. *Plant Cell*, 5:1681-92.
- Terada R, Nakayama T, Iwabuchi M, Shimamoto K (1995) A type I element composed of the hexamer (ACGTCA) and octamer (CGCGGATC) motifs plays a role(s) in meristematic expression of a wheat histone H3 gene in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol*, 27:17-26.
- Vauterin M, Frankard V, Jacobs M (1999) The Arabidopsis thaliana dhds gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Mol Biol*, 39:695-708.
- Walker JC, Howard EA, Dennis ES, Peacock WJ (1987) DNA sequences required for anaerobic expression of the maize Alcohol dehydrogenase-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6624-9.
- Washida H, Wu CY, Suzuki A, Yamanouchi U, Akihama T, Harada K, Takaiwa F (1999) Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant Mol Biol*, 40:1-12.
- Wu CY, Suzuki A., Washida H, Takaiwa F (1998) The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *Plant J*, 14:673-83.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6:251-64.