



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

***A *Fragaria vesca* L. cv. Rügen S-adenozil-L-metionin szintáz  
(FvSAMS) és dekarboxiláz (FvSAMDC) túltermeltetésének  
összehasonlító vizsgálata a sóstresszelt *Nicotiana benthamiana*  
növényekben***

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**KOVÁCS LÁSZLÓ**

**GÖDÖLLŐ**

**2018**

**A doktori iskola**

**Megnevezése:**

**Növénytudományi Doktori Iskola**

**Tudományága:**

**Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok**

**Vezetője:**

**Dr. Helyes Lajos**

Egyetemi tanár, az MTA doktora

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Kertészeti Technológiai Intézet

**Témavezető:**

**Dr. Kiss Erzsébet**

Professor emeritus

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai

Intézet

.....  
**Dr. Helyes Lajos**

**Iskolavezető**

.....  
**Dr. Kiss Erzsébet**

**Témavezető**

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A Szent István Egyetem Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet korábbi kutatásai során a szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta) receptákulum (gyümölcsrost) és az aszmag szövetek RNS-ujjlenyomatának tanulmányozásakor az érésben expressziós változást mutató géneket azonosítottak a gyümölcserés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszában. 130 transzkriptum eredetű fragmentumot, részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak meg. A szekvenált transzkriptumok között volt a poliamin metabolizmusban résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) és egy a poliamin és etilén metabolizmus közös prekursor molekuláját szintetizáló enzim gén, a S-adenozil-L-metionin (SAM) függő metiltranszferáz is (AY873806). Az általunk kiválasztott és vizsgálni kívánt SAM szintáz (*SAMS*) és SAM dekarboxiláz (*SAMDC*) nem szerepelt a szekvenált transzkriptumok között, azonban a *SAMS* szintetizálja az etilén és poliamin metabolizmus közös prekursor molekuláját a S-adenozil-L-metionint, míg a *SAMDC* termeli a dekarboxilált SAM-ot (dcSAM), ami a poliamin metabolizmus prekursor molekulája. Az etilén alapvető jelmolekula, a poliaminokkal együtt számos szabályozási mechanizmusban vesz részt a növények fejlődése és a termések érése során, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk szerepet játszhatnak-e a *SAMS* és a *SAMDC* gének a szamóca gyümölcs érésében.

Ugyanakkor mind az etilén, mind poliaminok fontos funkciót töltenek be a növények biotikus és abiotikus stresszválaszaiban, továbbá fokozott mennyiségben pozitív hatásuk van a növények sótoleranciájára is. Számos korábbi tanulmány számol be azonban az etilén és a poliamin metabolizmus antagonisztikus hatásáról különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására, ezért a két metabolizmus közös molekuláját a SAM-ot termelő SAM szintáz enzim, illetve a poliamin metabolizmus prekursor molekuláját a dekarboxilált SAM-ot szintetizáló SAM dekarboxiláz enzim túltermeltetésével tisztább képet alkothatunk a két metabolizmus különböző élettani folyamatokban betöltött szerepéről, ezáltal meg tudjuk határozni, hogy a „SAM többlet”, illetve a „SAM hiány” hogyan befolyásolja a poliamin/etilén arányt. Ebben a tanulmányban másik célul tűztük ki, hogy összehasonlító vizsgálatot végzünk a kontroll körülményeknek, illetve a hosszútávú sóstressznek kitett a nem utóérő *Fragaria vesca* L. cv. Rügen szamócából izolált *Fragaria vesca* SAM szintáz (FvSAMS) és SAM dekarboxiláz (FvSAMDC) enzimet túltermelő *Nicotiana benthamiana* vonalak és a vad típus között. Az eddigi tanulmányokban már külön-külön vizsgálták a *SAMS* és a *SAMDC* enzimek túltermeltetésének hatását a növények abiotikus stressztűrésére és bizonyították, hogy mind a *SAMS*, mind a *SAMDC* túltermeltetése fokozza a növények különféle abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját, egy kísérleti rendszerben azonban még nem vizsgálták ezt a két enzimet, ami lehetővé teszi, hogy a vizsgált növényélettani paraméterek kvantitatív módon viszonyíthatóak legyenek egymáshoz, így tisztább képet

alkothatunk a két enzim sóstresszben betöltött szerepéről. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy az eltérő etilén/poliamin arány milyen hatással van a növények fejlődésére, öregedésére és sótoleranciájára. A kísérletben a transzgénikus vonalakat és a vad típusú növényeket *in vitro* kontroll körülményeknek, illetve 10 mM NaCl stressznek tettük ki. Meghatároztuk az etilén és a poliaminok mennyiségét, a klorofill *a*, *b* és a lignin tartalmát, az ionveszteséget, a relatív H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és O<sub>2</sub><sup>-</sup> mennyiséget, a növekedési erélyt, a szárhosszt, a biomassza produktumot, a prolin tartalmát, valamint a transzgénikus levélkorongok nagy dózisu 300 mM NaCl stresszre adott válaszát. Emellett mértük az etilén és a poliamin, valamint a S-nikotin és a L-lignin metabolizmusában, illetve a SAM reciklizációjában résztvevő gének relatív expresszióját (*SAM szintáz*, *SAM dekarboxiláz*, *ACC szintáz*, *spermidin szintáz*, *spermin szintáz*, *S-adenozil-homocisztein hidroláz*, *putreszcin N-metiltranszferáz*, *fahéj-alkohol dehidrogenáz*), mivel ezek a gének olyan metabolizmusokban játszanak szerepet, amelyek számára a SAM szolgál szubsztrátként.

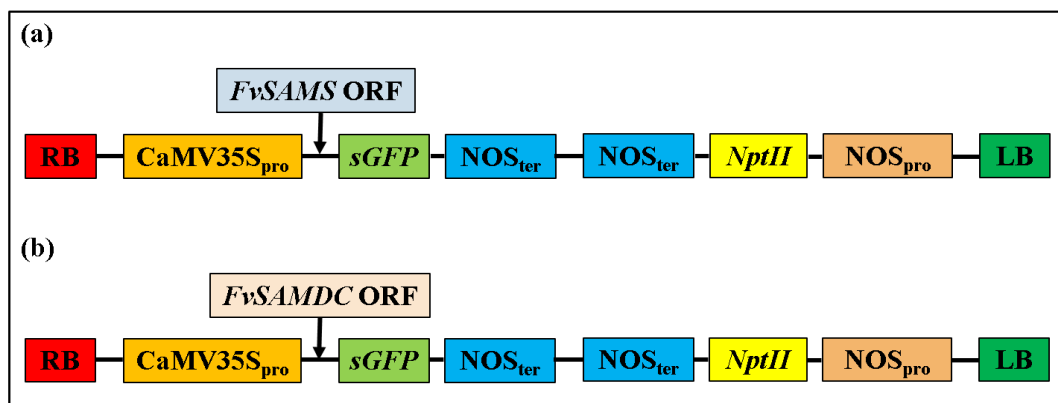
További célként tűztük ki, hogy meghatározzuk a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* enzimek szubcelluláris lokalizációját, illetve a lehetséges sejt-kompartimentbeli változását sóstressz hatására, mivel a kísérletben alkalmazni kívánt pGWB405 bináris vektor a konstitutív CaMV35S promótert tartalmazza és a vizsgálni kívánt inszertek (*FvSAMS*, *FvSAMDC*) a *sGFP*-vel történő C-terminális fúzionáltatásra alkalmas. A korábbi tanulmányokban a SAMS-t citoplazmás lokalizációjú enzimként jellemzik növényekben, de újabb kutatások szerint a patkány esetében, már sejtmagi és citoplazmás lokalizációt detektáltak, míg a SAMDC enzim esetében kloroplasztisz, mitokondriális és citoszolikus aktivitásról számolnak be a növényekben és citoplazmás lokalizációról emlősökben.

Végül célul tűztük ki, hogy bioinformatikai elemzéssel prediktáljuk a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* enzimek poszttranszlációs módosításában szerepet játszó lehetséges aminosav származékokat is.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### A felhasznált növényanyag és a génszekvenciák bioinformatikai elemzése

A gének izolálásához a *Fragaria vesca* L. cv. Rügen levélszövetét használtuk, mivel a *Fragaria vesca* teljes genomszekvenciája (Shulaev et al., 2011) elérhető a NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban és BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) analízissel azonosítani tudtuk a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* ORF-eket. A *FvSAMS* ORF 1182 bp (prediktált FvSAMS5 - XM\_004288294.2), míg a *FvSAMDC* ORF 1080 bp hosszú (prediktált FvSAMDC proenzim - XM\_011464655.1). A 4 különböző érési stádiumban lévő (zöld, fehér, rózsaszín és piros) gyümölcs (receptákulum és aszmag együtt) qPCR analíziséhez a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia-t használtuk, mivel köztermesztésben lévő fajtát akartunk vizsgálni. A primereket a *Fragaria vesca* genomra terveztük és PCR-rel ellenőriztük, hogy a megfelelő méretű fragmentumok amplifikálódnak-e a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta esetében is. A transzgenikus növények előállításához a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* szekvenciákat a pGWB405 bináris vektorba ligáltuk. A pGWB405 bináris vektor konstitutív CaMV35S promótert és a szekvenciák C terminális fúzionáltatására alkalmas *sGFP* riportergént tartalmaz. A baktériumok esetében a spektinomycin, míg a növényeknél a kanamicin a szelekciós marker (**1. ábra**). A szekvenciák bioinformatikai elemzéséhez a NetNES 1.1 (La Cour et al., 2004), a TargetP 1.1 (Emanuelsson et al., 2007), a cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009), a GPS-SNO 1.0 (Xue et al., 2010), a PHOSIDA (Gnad et al., 2011) és a Nucleolar localization sequence Detector (NoD) (Scott et al., 2011) alkalmazásokat használtuk.



**1. ábra:** A pGWB405::*FvSAMS* (a) és a pGWB405::*FvSAMDC* (b) bináris vektorkonstrukciók. Rövidítések: RB- Right border (jobb oldali határrégió); CaMV35S<sub>pro</sub> – Karfiol mozaik vírus 35S promóter; *sGFP* – Szintetikus zöld fluoreszcens fehérje gén; NOS<sub>ter</sub> – Nopalin szintáz terminátor; *NptII* – Neomicin foszfortranszferáz II; NOS<sub>pro</sub> – Nopalin szintáz promóter; LB – Left border (bal oldali határrégió).

## **Genomi DNS-, plazmid DNS-, RNS izolálás és cDNS szintézis**

A genomi DNS-t a DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), a plazmid DNS-t a PureYield<sup>™</sup> Plasmid Miniprep System Kit (Promega, Madison, USA), a totál RNS-t a Total RNA Mini Kit Plant (Geneaid<sup>®</sup>, New Taipei City, Taiwan) felhasználásával izoláltuk a gyártó által előírt protokoll alapján. A totál RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) alkalmazásával, a mRNS-ek visszairásához az Oligo (dT)<sub>18</sub> primert használtuk a gyártó által előírt protokoll alapján. A cDNS-eket a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* gének izolálásához és a RT qPCR vizsgálatokhoz használtunk fel a későbbiekben.

## ***Agrobacterium* közvetítette növénytranszformáció és tranziens expressziós vizsgálatok**

A *Nicotiana benthamiana* növény *Agrobacterium*-közvetítette transzformációjához az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-es törzset használtuk Clemente (2006) módszere alapján, melyek tartalmazták a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókat.

Tranziens expressziós vizsgálatokhoz ugyanezekkel a konstrukciókkal infiltráltuk az *in vivo* 35 napos *Nicotiana benthamiana* növények fiatal leveleit a Li (2011) által leírt módszer alapján.

## **A növénynevelési paraméterek a sótolerancia vizsgálatához**

A 2-2 3:1-es szegregációs arányt mutató független transzgenikus vonalak előszelekciónál MS táptalajon (50 µg/ml kanamicinnel kiegészítve), a vad típusú *Nicotiana benthamiana* magok csíráztatását antibiotikum-mentes MS táptalajon végeztük. A 14. napon a csíranövényeket antibiotikum-mentes ½-es MS táptalajra, illetve antibiotikum-mentes ½-es MS kiegészítve 0,58 g/l (10 mM) NaCl táptalajra helyeztük (hosszútávú sóstressz), a 60 mM-os sóstresszhez antibiotikum-mentes ½-es MS-t kiegészítve 3,5 g/l NaCl-al használtunk. A rövidtávú sóstressz vizsgálatához 40 napos növények 9 mm átmérőjű levélexplantumait antibiotikum-mentes ½-es MS kiegészítve 17,54 g/l (300 mM) NaCl táptalajra helyeztük. A növényeket és a levélexplantumokat 16 óra fény és 8 óra sötétben, 23°C-on tartottuk. A hosszútávú sóstressz esetén a mintákat a vetést követő 85. napon gyűjtöttük.

## **A klorofill *a* és *b* mennyiségének mérése**

A klorofill *a* és *b*, illetve az összklorofill tartalom meghatározását Porra et al. (1989) módszere alapján végeztük.

## **A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a O<sub>2</sub><sup>-</sup> hisztokémiai detektálása**

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nak és az O<sub>2</sub><sup>-</sup>-nak a hisztokémiai meghatározását Kumar et al. (2014) módszere alapján határoztuk meg. A képeket Fuji FinePix S6500fd géppel készítettük.

### **A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiség mérése**

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségének meghatározását Velikova et al. (2000) által leírt módszer alapján végeztük. A standard görbe készítéséhez 30%-os (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) használtunk.

### **Az ionveszteség mérése**

Az ionveszteség mérését Rizhsky et al. (2002) protokollja szerint végeztük.

### **A prolin mennyiségének szemikvantitatív meghatározása**

A prolin mennyiségének szemikvantitatív meghatározását izatinos papír módszerrel hajtottuk végre (Ábrahám et al., 2010).

### **A lignin tartalom mérése**

A hajtások lignin mennyiségének meghatározására Moreria-Vilar et al., (2014). acetyl-bromidos (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>BrO) módszerét alkalmaztuk.

### **Az etilén termelés mérése**

A levéllemezek etilén kibocsátását Langebartels et al. 1991-ben leírt módszerével határoztuk meg.

### **A poliaminok mennyiségének meghatározása HPLC-vel**

A szabad poliaminok mennyiségének meghatározását Németh et al. (2002) által leírt módszer alapján végeztük. A szabad poliamin frakció esetében a származékot danzil-kloriddal képeztük Smith és Davies (1985) módszere szerint.

### **Relatív expressziós vizsgálatok qPCR-rel**

A vizsgálni kívánt gének relatív expressziójának vizsgálatához primereket terveztünk a génszekvenciákra. A reakciókat Corbett RG-6000 készülékkel végeztük. A reakcióelegy összetevői (20 µl végtérfogatra): 10 µl 2xABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1,75 µl/primer (70 nM), 1 µl cDNS (hígítás: 1/50), mintánként 4 technikai és 3 biológiai ismétlést alkalmaztunk. A relatív expressziós szintek meghatározásához a Rotor-Gene Q Series 2.3.1. szoftver 'Comparative Quantification' metódusát használtuk (Warton et al., 2004, McCurdy et al., 2008). A *Nicotiana benthamiana* esetében a GAPDH, míg a szamóca gyümölcsnél az actin volt a viszonyítási alapot képező referencia háztartási gén.

### **Mikroszkópos vizsgálat**

A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjéket Leica TCS SP8 lézerletapogatóval konfokális és Leica/Leitz DMRB 301-371.010 fluoreszcens sztereó

mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Germany) detektáltuk.. A vizsgált levélszintek leveleiből a levéllemezek apikális részén 4\*4 mm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket natív módon fixálás nélkül vizsgáltuk a levelek adaxiális oldaláról, a fedéshez 1:1 glicerin:bideszt víz elegyet alkalmaztunk. A képek felskálázásához és szerkesztéséhez a Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0 szoftvert használtuk.

Az endoplazmatikus retikulum jelöléséhez CellLight™ ER-RFP, BacMam 2.0 reagenst használtunk (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). A gyártó által javasolt protokollal ellentétben, ami sejtszuspenzióra vonatkozott, mi az élő szövetbe infiltráltuk a reagenst (100 szoros hígításban) és 16 óra szobahőmérsékleten történő inkubáció után fixáltuk a szöveteket (Fixáló oldat: 4%-os paraformaldehid; 0,1% Tween 20; 0,1% Triton X-100; 0,15 M NaCl; 10 mM nátrium-foszfát puffer pH 7,5). A sGFP relatív fluoreszcenciájának meghatározását ImageJ 1.50b szoftverrel végeztük (Schneider et al., 2012).

A mikroszkóp analízishez használt *FvSPDS::sGFP* konstrukciót mi építettük, ugyancsak pGWB405 vektort alkalmazva, az inszert a *Fragaria vesca* L. cv. Rügen-ből izolált *spermidin szintáz* gént kódolja. A *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérje csak citoplazmás lokalizációt mutatott és citoplazmás kontrollként alkalmaztuk.

### **Statisztikai analízis**

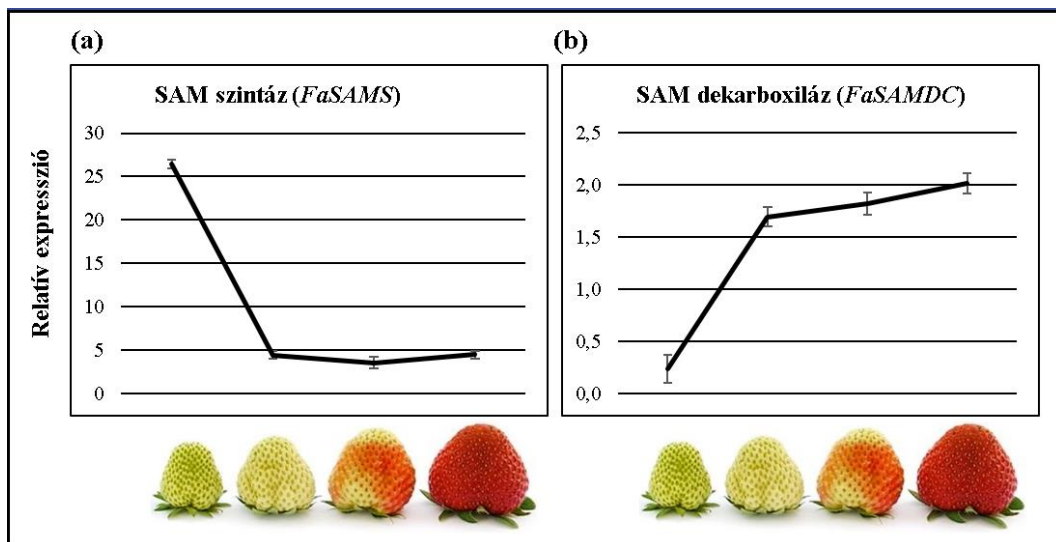
Az eredmények legalább 3-5 mérésből származnak. Statisztikailag a standard szórás és az ANOVA módszerek alkalmazásával elemeztük az adatokat. A kiértékeléshez a Microsoft Excel alkalmazást használtuk.



## EREDMÉNYEK

### A *FaSAMS* és a *FaSAMDC* expressziós mintázata a szamóca gyümölcs érése során

Mind az etilén, mind a poliaminok fontos szerepet játszanak a gyümölcsök érésében, ezért mi is vizsgáltuk az endogén *FaSAMS* és *FaSAMDC* gének relatív expresszióját qPCR-rel a *Fragaria x ananassa* D. cv. Asia négy különböző érési stádiumú (zöld, fehér, rózsaszín és piros) gyümölcsében (receptákulum és aszmag együtt). A *Fragaria vesca* genomra tervezett primerek a PCR-rel történő ellenőrzés során 100%-osan működtek a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta genom DNS-ével és cDNS-ével is. A *FaSAMS* gén esetében ~6-7-szer nagyobb relatív expressziót mértünk a zöld érési stádiumban lévő gyümölcsben, mint a későbbi három fázisban. A *FaSAMS*-hez viszonyítva fordított expressziós mintázatot kaptunk a *FaSAMDC* gén esetében, a zöld gyümölcsben ~7-8,5-ször alacsonyabb relatív expressziót detektáltunk, mint a fehér-, rózsaszín- és piros érési stádiumokban (**1. ábra**).



**1. ábra:** A *FaSAMS* (a) és a *FaSAMDC* (b) gének relatív expressziója a szamóca gyümölcs négy különböző érési stádiumában. SD±, n=4 (P<0,001).

### A hosszútávú sóstressz hatásának vizsgálata a *FvSAMS*-t, *FvSAMDC*-t túltermelő és a vad típusú *Nicotiana benthamiana* növények élettani paramétereire

Az élőtömeg jól tükrözi a növények sóstresszre adott válaszát, így a biomassza vizsgálatával egy skálát lehet képezni a tolerancia szintjének meghatározásához, ezért vizsgáltuk, hogy a hosszútávú sóstressz miként befolyásolja a *FvSAMS*, *FvSAMDC* vonalak és a vad típusú növények biomassza produktumát és hajtáshosszát.

A kísérletbe állított transzgénikus *Nicotiana benthamiana* T<sub>1</sub> vonalak fokozottabb hajtás-, gyökértömeget és hajtáshosszt produkáltak, mind kontroll, mind 10 mM NaCl stressznek kitett körülmények között a vad típusúhoz viszonyítva.

Ahhoz, hogy meggyőződjünk arról, hogy a nagyobb biomassza produktum és a fokozott növekedési erély nemcsak alacsony dózisu sóstressz (10 mM NaCl) esetében jelentkezik, nagyobb dózisu 60 mM NaCl stressznek is kitéttük a transzgenikus vonalakat és a vad típust. A FvSAMS és a FvSAMDC túltermeltetése is fokozta a transzgenikus vonalak növekedési erélyét 60 mM NaCl stressz hatására, ami a nagyobb biomassza produktumban nyilvánult meg. A sóstresszt követő 30. napon a biomasszában mért különbségek még nem voltak szignifikánsan nagyobbak a transzgenikus vonalakban, de a sóstresszt követő 60. és 90. napon a FvSAMS és a FvSAMDC vonalakban is szignifikánsan nagyobb száraztömeget mértünk a vad típushoz viszonyítva. A vizsgálat alapján látható, hogy nemcsak a kisebb 10 mM NaCl, hanem a nagyobb dózisu 60 mM NaCl stressz esetén is fokozottabb biomasszát produkáltak a transzgenikus vonalak a vad típushoz viszonyítva.

Vizsgáltuk a FvSAMS, a FvSAMDC vonalak és a vad típusú *Nicotiana benthamiana* levélkorongjainak rövid idejű, nagy dózisu sóstresszre (300 mM NaCl) adott válaszreakcióját. A vad típusú levélkorongok sejtjei a kezelést követő 48 óra elteltével már szinte teljesen elpusztultak, míg a FvSAMS és a FvSAMDC levélkorongok sejtjeinél hasonló mértékű elhalás a kezelést követő 96 órával következett be. A 300 mM NaCl stressznek kitétt levélkorongok relatív klorofill tartalmát is vizsgáltuk. A kezelést követő 24 óra elteltével a FvSAMDC vonalak levélkorongjaiban a klorofill degradáció jóval nagyobb volt, mint a FvSAMS vonalak esetében, de a kezelést követő 48-, 72- és 96 óra elteltével már hasonló mértékű klorofill degradációt mértünk mindkét transzgenikus vonal levélexplantumaiban.

A klorofill tartalom információt ad a növények fiziológiai állapotáról, ezért vizsgáltuk a hosszútávú 10 mM NaCl stressz hatását a transzgenikus vonalak és a vad típus összklorofill tartalmára. Kontroll körülmények között mind a FvSAMS vonalak, mind a FvSAMDC vonalak klorofill *a* és *b* tartalma szignifikánsan magasabb volt a vad típusúnál. A sóstressz hatására a transzgenikus vonalakban és a vad típusban is csökkent a klorofill tartalom, de a FvSAMS és FvSAMDC vonalakban szignifikánsan nagyobb összklorofill tartalmat mértünk, mint a vad típusban.

A ROS-ok (a szuperoxid anion  $/O_2^-/$ , a hidrogénperoxid  $/H_2O_2/$ , a hidroxil gyök( $\cdot OH$ ) és a szinglet oxigén  $/^1O_2/$ ) termelődésének az egyik fő helyszíne a kloroplastisz (Mignolet-Spruyt, 2016). A ROS-ok homeosztázisa megváltozik stresszek hatására, míg nagy koncentrációban károsítják a sejtet, addig kis koncentrációban szignál molekulaként viselkednek a stresszek felismerésében és a stresszválaszokban. A ROS-ok, mint a  $H_2O_2$  és az  $O_2^-$  felhalmozódása a szövetekben egyenes arányban áll a sejtek stresszeltségi fokával, ezért hisztokémiai festéssel vizsgáltuk a szövetek  $H_2O_2$  és  $O_2^-$  tartalmát. Kontroll körülmények között alig volt detektálható a  $H_2O_2$ , mind a transzgenikus vonalakban (FvSAMS, FvSAMDC), mind pedig a vad típusban. A

sóstressz hatására viszont a vad típusú levelek már nagyobb mértékű elszíneződést, ezáltal nagyobb  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmat mutattak a transzgenikus vonalakhoz (FvSAMS, FvSAMDC) képest. A vad típusban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  eloszlása viszonylag homogén volt, míg a FvSAMDC vonalak esetében a levélnyel körüli részekre, addig a FvSAMS vonaloknál a levél peremére koncentrált  $\text{H}_2\text{O}_2$  eloszlása. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalommal ellentétben az  $\text{O}_2^-$  tartalmat már kontroll körülmények között is detektáltunk körben a levelek széleinél, mind a vad típusban, mind a transzgenikus vonalokban (FvSAMS, FvSAMDC). A sóstressz hatására hasonlóan a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -nál kapott eredményekhez, itt is a vad típusú levelek színeződtek jobban, tehát nagyobb volt az  $\text{O}_2^-$  tartalmuk a transzgenikus vonalakhoz (FvSAMS, FvSAMDC) viszonyítva. A transzgenikus vonalokban az  $\text{O}_2^-$  eloszlásában nem volt megfigyelhető hasonló eltérés, mint a  $\text{H}_2\text{O}_2$  esetében.

A levelek  $\text{H}_2\text{O}_2$  és az  $\text{O}_2^-$  hisztokémiai festéssel történő meghatározását követően megmértük a transzgenikus vonalak (FvSAMS, FvSAMDC) és a vad típusú növények leveleinek  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyiségét kontroll körülmények és sóstressz hatására. A FvSAMS vonalokban kontroll körülmények között kevesebb  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t mértünk, de a különbség nem volt szignifikáns, míg sóstressz esetén kevesebb  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t detektáltunk szignifikáns különbséggel. A FvSAMDC vonalokban mind kontroll körülmények között, mind a sóstressz hatására szignifikánsan kevesebb  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyiséget mértünk a vad típushoz viszonyítva.

A túlzott ROS felhalmozódás oxidatív stresszt vált ki, ami lipidperoxidációt és a membránok sérülését, végül sejthalált okoz, ezért a következő lépésben vizsgáltuk a levélkorongok ionvesztését kontroll körülmények és hosszútávú sóstressz esetén. Az alacsonyabb ROS szinteket támasztják alá a mérések, mivel mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalokban alacsonyabb ionvesztést mértünk kontroll és sóstressz hatására is, mint a vad típusban.

A korábbi tanulmányok arról számolnak be, hogy a *SAMS* és a *SAMDC* túltermelése is fokozza az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását a fokozott poliamin bioszintézisen keresztül. A poliaminok kétféle módon kontrollálhatják a ROS-ok homeosztázisát. Az egyik útvonalon gátolhatják a fémek auto-oxidációját, ami a ROS-ok generálásához szükséges elektron mennyiséget csökkenti. A másik útvonal közvetlenül fokozza az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását és feltehetően ez okozza a  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\text{O}_2^-$  mennyiségének csökkenését is transzgenikus vonalokban. A poliaminok és a ROS-ok közötti kölcsönhatás feltehetőleg a plazmamembránon megy végbe, ahol a poliaminok a pozitív töltésük miatt blokkolni tudják a kationcsatornákat. Összefoglalva feltételezhető, hogy a csökkent  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\text{O}_2^-$  mennyiséget, ezáltal a fokozott membránintegritást a nagyobb mennyiségű poliaminok okozhatták közvetve a *FvSAMS* és *FvSAMDC* túltermelő vonalokban.

A ROS-ok mellett a sejtekben felhalmozódó prolin mennyisége is információt ad a növények stresszeltségi fokáról. A prolint egy stresszeltségi állapotot jelző aminosavnak

tekintenek, mivel számos növényfajban halmozódik fel környezeti stresszek hatására, ezért vizsgáltuk a kontroll és a sóstresszelt transzgenikus és a vad típusú növények leveleinek prolin tartalmát. A FvSAMS vonalakban kontroll körülmények között enyhén emelkedett, illetve megközelítőleg azonos prolin mennyiségeket mértünk, mint a vad típusban képest, míg sóstressz hatására prolin többlet volt kimutatható a FvSAMS transzgenikus vonalakban, de a különbség nem volt szignifikáns a vad típushoz viszonyítva. A FvSAMDC vonalak esetében kontroll körülmények között enyhe prolin többletet, míg sóstressz hatására szignifikánsan nagyobb prolin mennyiséget mértünk a vad típusú növényekben mért értékekhez képest, amelyekben a stressz hatására csak enyhén nőtt a prolin mennyisége. A fokozott prolin mennyiségnek számos pozitív hatása van az abiotikus stressztoleranciára és a prolin felhalmozódás egyenes arányban áll a nagyobb összpoliamin szintekkel még akkor is, ha közös prekursoron, a glutaminsavon (Glu) osztoznak. Eredményeink alapján a *FvSAMS* enyhén, míg a *FvSAMDC* túltermeltetése jelentős mértékben fokozta a prolin tartalmat sóstressz hatására, ami összhangban van a FvSAMDC vonalagnál mért nagyobb össz szabad poliamin tartalommal, viszont a FvSAMS vonalagnál mért nagyobb össz szabad poliamin tartalom sóstressz hatására nem mutatott pozitív korrelációt a detektált prolin tartalommal.

A lignin a legfőbb metabolikus fogyasztója a SAM-nak, ezért vizsgáltuk, hogy a 'SAM hiány' és a 'SAM többlet' hogyan befolyásolja a növények lignin tartalmát kontroll és sóstressz hatására. A lignin a növények egyedfejlődése során az elsődleges és a másodlagos sejtfal között halmozódik fel és növeli annak szilárdságát, a nagyobb szilárdság fokozza a növények biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját. Kontroll körülmények között a transzgenikus vonalakban (FvSAMS, FvSAMDC) szignifikánsan magasabb lignin tartalmat detektáltunk a vad típushoz viszonyítva. A sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS vonalakban is növekedett a lignin mennyisége, míg a FvSAMDC vonalakban a kontroll körülményekhez képest csökkent a lignin tartalom, ami szignifikánsan kevesebb volt, mint a vad típusban. Méréseink alapján kontroll körülmények között mind a 'SAM hiány', mind a 'SAM többlet' fokozta a lignifikációt a transzgenikus vonalakban, azonban sóstressz hatására a 'SAM hiány' jelentős mértékben redukálta, míg a 'SAM többlet' jelentősen növelte a lignin felhalmozódását, ami közvetlen módon fokozhatta a FvSAMS vonalak sóstressz elleni toleranciáját.

Mivel a SAM a közvetlen prekursor molekulája az etilén bioszintézisnek és az etilén számos stresszválaszban játszik szerepet, ezért vizsgáltuk, hogy a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése, hogyan befolyásolja az etilén mennyiségét kontroll és sóstressz hatására. Mind az etilén, mind poliaminok fontos szabályozó szerepet játszanak a növények biotikus és abiotikus stresszválaszaiban, számos korábbi tanulmány számol be azonban az etilén és a poliamin metabolizmus antagonisztikus hatásáról különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására.

Eredményeink alapján a FvSAMS vonalakban, mind a kontroll, mind a sóstresszelt növényekben enyhén alacsonyabb etilén mennyiségeket mértünk a vad típushoz viszonyítva. A kontroll körülmények között a FvSAMDC enzimet túltermelő vonalakban enyhén több etilént mértünk, mint a vad típusban, de a különbség nem volt szignifikáns, míg sóstressz hatására az etilén mennyisége szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típusú növényekben, amelyekben a sóstressz hatására enyhe csökkenés volt megfigyelhető a kontroll körülmények között mért értékekhez képest.

A poliaminok szerepet játszanak az ozmotikus szabályozásban, a membránstabilitásban, a szabad gyökök eltávolításában és a sztómák mozgásának szabályozásában az abiotikus stressz alatt, ezért vizsgáltuk, hogy a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése hogyan befolyásolja az etilén mellett a poliamin mennyiségeket kontroll és hosszútávú sóstressz hatására. A putreszcin mennyisége csak a FvSAMDC vonalakban volt szignifikánsan nagyobb a kontroll körülmények között és a sóstressz hatására is, míg a FvSAMS vonalak esetében sóstressz hatására szignifikánsan alacsonyabb Put mennyiségeket detektáltunk. A spermidin (Spd) mennyisége mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan magasabb volt kontroll és sóstressz hatására is, de nagyobb mértékben a FvSAMDC vonalakban növekedett. A spermin (Spm) mennyisége csak a FvSAMDC vonalakban volt szignifikánsan nagyobb kontroll és sóstressz esetén is, míg a FvSAMS vonalak esetében csak sóstressz hatására detektáltunk szignifikánsan magasabb Spm mennyiségeket. Az össz szabad poliamin (PA) tartalom mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalakban szignifikánsan magasabb volt kontroll körülmények között és sóstressz hatására is, de a *FvSAMDC* túltermeltetése jelentősebb mértékben fokozta az össz szabad poliamin szintet, míg a "SAM többlet" a FvSAMS vonalakban kisebb mértékű felhalmozódást okozott. A FvSAMDC vonalak esetében mért nagyobb spermidin és spermin mennyiségek és a fokozott etilén produktum a sóstressz hatására összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal, ugyanakkor a FvSAMS vonalakban mért nagyobb spermidin és spermin mennyiségek mellett csökkent etilén termelődést detektáltunk sóstressz esetén. A FvSAMDC vonalakban mért adatok alapján úgy tűnik, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására. Méréseink alapján a számos korábbi tanulmánnyal ellentétben az etilén és poliamin bioszintézis nem volt antagonistá hatással egymásra az általunk vizsgált kísérleti rendszerben.

Vizsgáltuk az etilén metabolizmusban [SAM szintáz (*SAMS*); ACC szintáz (*ACS*)], a poliamin metabolizmusban [SAM szintáz (*SAMS*); SAM dekarboxiláz (*SAMDC*); spermidin szintáz (*SPDS*); spermin szintáz (*SPMS*)], a SAM reciklizációjában [SAH hidroláz (*SAHH*)] és két másodlagos metabolit, a nikotin [putreszcin N-metiltranszferáz (*PMT*)] és a lignin [fahéjalkohol dehidrogenáz (*CAD*)] bioszintézisében résztvevő gének relatív expresszióját, mivel ezek a gének

olyan metabolizmusokban játszanak szerepet, amelyek számára a SAM szolgál szubsztrátként. Mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalakban a *SAMS*-nak, a *SAMDC*-nak, a *SPMS*-nak, a *SAHH*-nak és a *CAD*-nak szignifikánsan nagyobb volt az expressziója kontroll és sóstressz hatására is a vad típushoz viszonyítva. Az *ACS* relatív expressziója kontroll körülmények között a FvSAMS és a FvSAMDC transzgenikus vonalakban is alacsony szintet mutatott, de a sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS vonalakban a kontroll körülmények között mért értékekhez képest is alacsonyabb *ACS* expressziót mértünk (a FvSAMS vonalak esetében a vad típushoz viszonyítva is alacsonyabbat), míg a FvSAMDC vonalakban szignifikánsan magasabb *ACS* expressziót figyeltünk meg, mint a vad típusban. A FvSAMS vonalakban a *SPDS* gén esetében kontroll körülmények között alacsonyabb expressziót, míg a FvSAMDC vonalakban enyhén magasabb expressziót mértünk a vad típushoz viszonyítva, de különbség nem volt szignifikáns. A *SPDS* relatív expressziója sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS, FvSAMDC transzgenikus vonalakban is növekedett, de a FvSAMS és a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a vad típushoz viszonyítva. A *PMT* szintetizálja a N-metilputreszcint, ami a kiindulási szubsztrátként szolgál a nikotin bioszintézisében. A *PMT* relatív expressziója kontroll körülmények között szignifikánsan alacsonyabb a FvSAMS vonalakban, míg a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusban, de sóstressz hatására mind a 4 transzgenikus vonal esetében szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a vad típushoz viszonyítva. A lignin bioszintézisben résztvevő fahéj-alkohol dehidrogenáz (*CAD*) relatív expressziója a transzgenikus vonalakban (FvSAMS, FvSAMDC) kontroll körülmények között szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusban, míg sóstressz esetén enyhe növekedés volt megfigyelhető a *CAD* relatív expressziójában a vad típusban és a FvSAMS vonalak esetében is. A FvSAMDC vonalakban a *PMT*-hez hasonlóan jelentősen növekedett a *CAD* relatív expressziója is, de a FvSAMDC vonalakban a *CAD* magas relatív expressziója sóstressz hatására, nem állt pozitív korrelációban a mért lignin mennyiségekkel.

Összefoglalva a *FvSAMS* túltermeltetése fokozta a *SAMS*, a *SAMDC*, a *SPDS*, a *SPMS*, a *SAHH* és a *CAD* gének relatív expresszióját, azonban az *ACS* expressziója csökkent értéket mutatott, amit a mért etilén mennyiségek is igazoltak, míg a *FvSAMDC* túltermeltetése növelte a *SAMS*, a *SAMDC*, az *ACS*, a *SPDS*, a *SPMS*, a *SAHH*, a *PMT* és a *CAD* relatív expresszióját is sóstressz hatására.

A kontroll körülmények között és a 10 mM NaCl stresszelt FvSAMS-22, FvSAMS-25, FvSAMDC-73, FvSAMDC-76 transzgenikus vonalakban és a vad típusban mért növényélettani paraméterek összesítését az **1. táblázatban** foglaltuk össze. A változás mértékét a vad típushoz viszonyítva adtuk meg.

**1. táblázat:** A FvSAMS és a FvSAMDC vonalakban mért növényélettani paraméterek összesítő táblázata a vad típushoz (WT) viszonyítva. A ↑ nyíl a növekedést, a ↓ nyíl az értékek csökkenését mutatja. A számok a ‘szoros’ változást jelzik.

	FvSAMS	FvSAMDC	FvSAMS	FvSAMDC
	Kontroll körülmények (* -os változás)		10 mM NaCl stressz (* -os változás)	
Biomassza produktum/WT	~ 1,5 (↑)	~ 1,9 (↑)	~ 2 (↑)	~ 2,6 (↑)
Hajtáshossz/WT	~ 1,4 (↑)	~ 1,5 (↑)	~ 1,6 (↑)	~ 1,9 (↑)
Klorofill <i>a</i> és <i>b</i> tartalom/WT	~ 1,3 (↑)	~ 1,6 (↑)	~ 1,7 (↑)	~ 1,9 (↑)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mennyiség/WT	~ 1,2 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 1,3 (↓)	~ 1,8 (↓)
Ion veszteség/WT	~ 1,3 (↓)	~ 1,8 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 1,9 (↓)
Prolin tartalom/WT	~ 1,1 (↑)	~ 1	~ 1,2 (↑)	~ 4,3 (↑)
Lignin tartalom/WT	~ 2,8 (↑)	~ 1,8 (↑)	~ 1,7 (↑)	~ 1,5 (↓)
Étilén termelés/WT	~ 1,1 (↓)	~ 1,1 (↑)	~ 1,1 (↓)	~ 1,5 (↑)
<b>Szabad poliamin tartalom</b>				
Put/WT	~ 1,1 (↓)	~ 1,3 (↑)	~ 1,2 (↓)	~ 1,2 (↑)
Spd/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,8 (↑)
Spm/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,8 (↑)
Össz szabad PA/WT	~ 1,1 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,7 (↑)
<b>Relatív expressziós mérések</b>				
SAMS/WT	~ 1,8 (↑)	~ 2,0 (↑)	~ 3,9 (↑)	~ 2,4 (↑)
SAMDC/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,6 (↑)
ACS/WT	~ 1,2 (↓)	~ 1,1 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 2,2 (↑)
SPDS/WT	~ 1	~ 1,1 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,4 (↑)
SPMS/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,4 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,5 (↑)
SAHH/WT	~ 1,5 (↑)	~ 1,8 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)
PMT/WT	~ 4,8 (↓)	~ 2,4 (↑)	~ 3,0 (↑)	~ 34,9 (↑)
CAD/WT	~ 1,7 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,4 (↑)	~ 5,1 (↑)

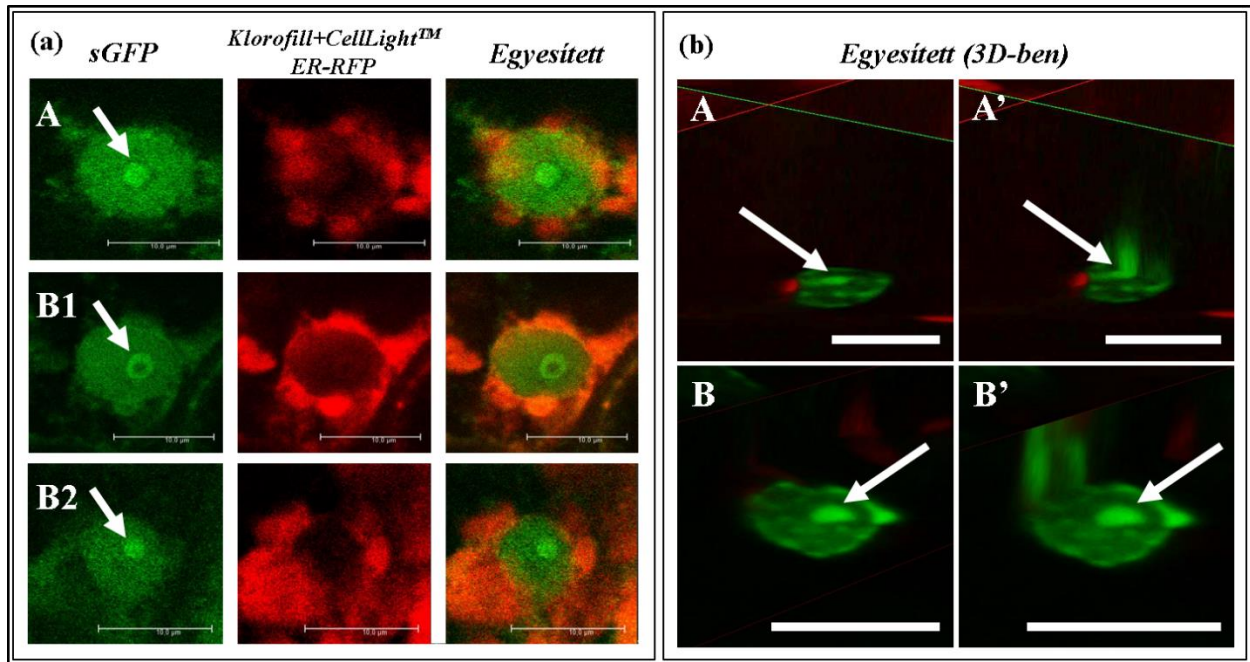
A mérések alapján az a következtetés vonható le, hogy a kontroll körülmények között mért prolin-, valamint a kontroll és a sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével a FvSAMDC túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgenikus vonalak növényélettani paramétereit mind kontroll körülmények, mind 10 mM NaCl stressz hatására, mint a FvSAMS overexpressziója.

## A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék szubcelluláris lokalizációjának meghatározása és az aminosav szekvenciák bioinformatikai elemzése

Első lépésben tranziens expresszióval vizsgáltuk a *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP*, a *FvSPDS::sGFP* (nem publikált, saját konstrukció) és a *35S<sub>pro</sub>::sGFP* (nem publikált, saját konstrukció) fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációját. A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *35S<sub>pro</sub>::sGFP* konstrukció tranziens expressziós vizsgálata során sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, míg a korábbi megfigyelések alapján már detektált *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérje esetében csak citoplazmás lokalizációt tapasztaltunk a *Nicotiana benthamiana* levelek epidermális sejtjeiben. A tranziens expresszió során felfigyeltünk arra, hogy mindhárom vektorkonstrukció (*FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *35S<sub>pro</sub>::sGFP*) mutatott endoplazmatikus retikulum jelet, ezért endoplazmatikus retikulum (ER) jelölést használtunk a CellLight™ ER-RFP alkalmazásával. A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós konstrukció esetén gyengébb endoplazmatikus retikulum jelet detektáltunk, mint a kontroll *35S<sub>pro</sub>::sGFP* konstrukcióval. A stabil *FvSAMS* és a *FvSAMDC* transzformánsok esetében nem tapasztaltunk hasonló jelenséget, ezért azt feltételezzük, hogy az infiltráció okozta mechanikus és biotikus stresszre adott választ figyeltük meg, mivel mind a biotikus, mind az abiotikus stresszek a kigombolyodott fehérjék felhalmozódását okozzák, amit az endoplazmatikus retikulum membránjának specifikus szenzor fehérjéi érzékelnek. Ezek a szenzor fehérjék a hősokk- (chaperonok) és más fontos fehérjéket kódoló gének expresszióját váltják ki, amelyek fokozhatják a fehérjék gombolyítási kapacitását, illetve ER-hez kapcsolt degradációját (ERAD). A kigombolyodott fehérjékre adott válasz egy konzervált stresszreakció az eukariótákban, a jelenséget UPR-nek (UPR – Unfolded Protein Response) nevezzük, és feltehetően a kigombolyodott fehérjék ER-hez kötött degradációját (ER associated degradation - ERAD) figyeltük meg. Az ER-jelöléshez a levélszöveteket fixáltuk, ami a sGFP jel gyengülését okozta, így vehettük észre a *FvSAMS::sGFP* esetében a külön sejtmagi és sejtmagvacska jelet, amit a stabil transzformánsok esetében is láttunk a sejtmagokról készült 3 dimenziós képeken. A *SAMS* sejtmagvacska lokalizációját korábban még nem publikálták. A *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérje tranziens expresszió során detektált és a stabil transzformánsokban megfigyelt sejtmagvacska lokalizációja a **2. ábrán** látható. A növényekben a sejtmagvacska három komponensből épül fel: a fibrilláris centerből (FC - Fibrillar Center), a sűrű fibrilláris komponensből (DFC - Dense Fibrillar Component) és a granuláris komponensből (GC - Granular Component). A **2. / a / B1** képen megfigyelhető, hogy a fibrilláris center kivételével vagy a sűrű fibrilláris komponensben vagy a granuláris komponensben vagy mindkettőben lokalizálódik a *FvSAMS::sGFP*. Mindkét sejtmagvacska komponens a riboszómák biogenezisében vesz részt, a DFC tartalmazza a fibrillarin fehérjét, ami a riboszómális RNS-ek (rRNS) érésében játszik szerepet. A *Nicotiana benthamiana* Fibrillarin2 (*NbFib2*) fehérjén már azonosítottak egy MTáz



(AdoMet függő metiltranszferáz) régiót, ami SAM-kötő motívumokat tartalmaz és sejtmagvacska lokalizációval rendelkezik, tehát a *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációja a riboszóma szintézisben való szerepére utalhat azáltal, hogy *in situ* állítja elő a legfőbb metil-csoport donort, a SAM-ot.



**2. ábra:** A *FvSAMS::sGFP* jel az epidermális sejtek sejtmagvacskájában tranziens expresszióval vizsgálva (a). A *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációja a stabil transzformánsok oszlopos parenchima sejtjeiben 3 dimenzióban (3D) szemléltetve. Az A-A' és a B-B' képek ugyanarról a sejtmagról készültek (b). Az ábrán fehér nyilakkal jelöltük a *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációját. A vonal 10 μm-t jelöl.

A stabil transzformánsokban is vizsgáltuk a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék lokalizációját kontroll körülmények között és sóstressz hatására is (3. / a ábra). A stabil transzformánsok oszlopos parenchima sejtjeiben megfigyeltük, hogy a *FvSAMS::sGFP* nem homogén citoplazmás eloszlást mutat, hanem a citoplazma legkülsőbb régiójában a plazmalemma és a kloroplaszt plazmamembrán környékén lokalizálódik (4. ábra). Tehát a tranziens expresszió és a stabil transzformánsokban megfigyelt *FvSAMS::sGFP* lokalizációja alapján a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán, szubcelluláris lokalizációt mutat, ami arra utal, hogy a SAM számos bioszintézishez *in situ* termelődik (pl.: genomi DNS, RNS, fehérjék metilálásához; kloroplaszt DNS, RNS, RUBISCO enzim metilálásához; lignin bioszintézishez; riboszómák bioszintéziséhez). A SAMS-t citoplazmás lokalizációjú enzimeként jellemzik a növényekben, de újabb kutatások szerint a patkány esetében, már sejtmagi és citoplazmás lokalizációról számolnak be. A vizsgált patkányszövetben a metionin adenoziltranszferáz (MAT=SAMS) I/III izoenzimek mind sejtmagi, mind citoplazmás lokalizációt mutattak. A sejtmagi lokalizációt főként a májon

kívüli szövetekben figyelték meg és bizonyították, hogy a fehérje C terminális doménjének struktúrája határozza meg mind a sejtmagi, mind a citoplazmás lokalizációt, továbbá a MAT1 sejtmagi felhalmozódása pozitív korrelációt mutatott a hiszton H3K27 trimetiléződésével, ami a feltételezések szerint gátolhatja a transzkripciót. A tranzien expressziós vizsgálatokhoz hasonlóan a *FvSAMDC::sGFP* a stabil transzformánsokban is a sejtmagban és a citoplazmában volt megfigelhető.

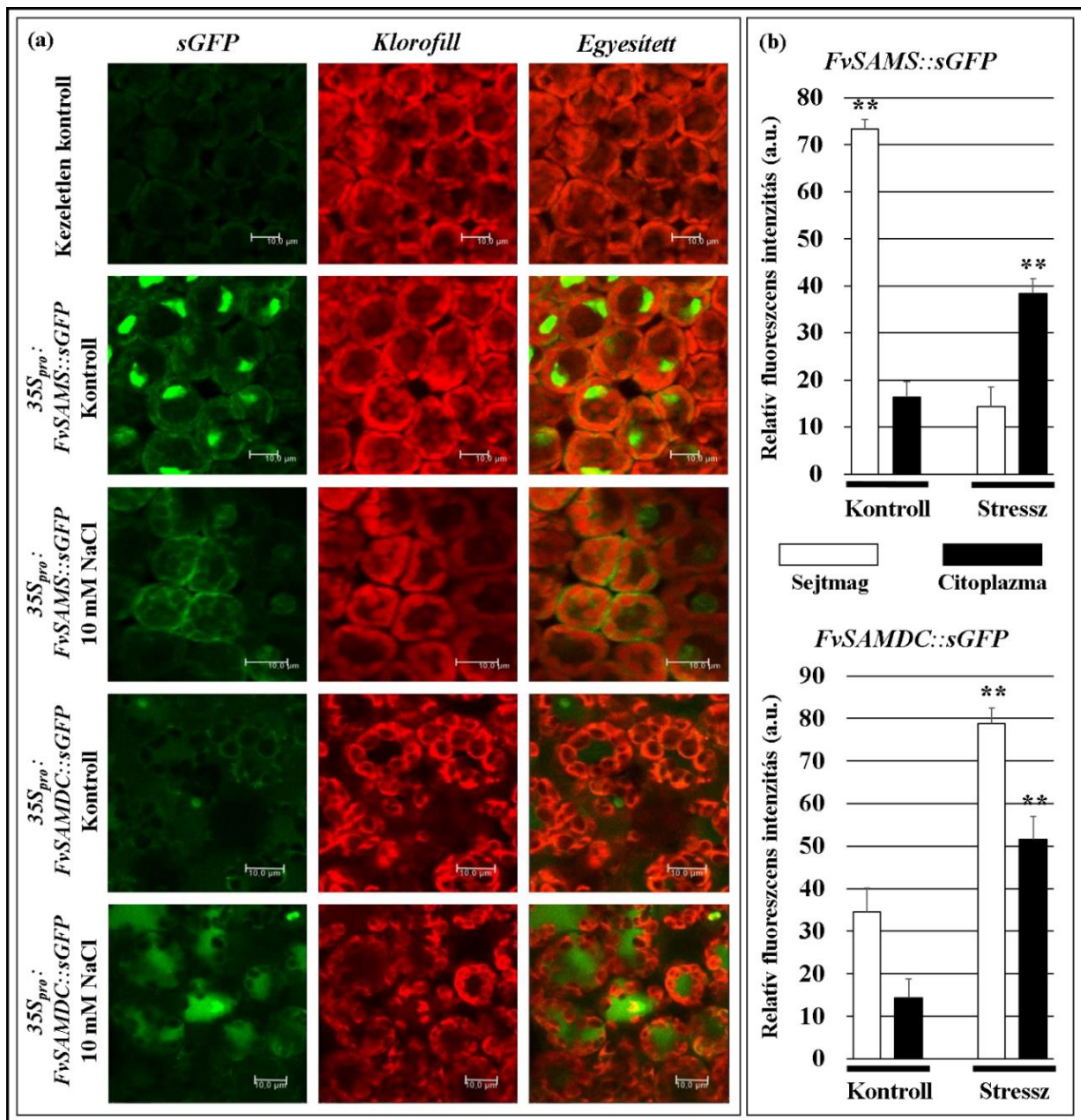
A **3. / a ábrán** látható, hogy kontroll körülmények között a *FvSAMDC::sGFP* gyenge sejtmagi és homogén citoplazmás lokalizációt mutat és sóstressz hatására a fúziós fehérje mennyisége nagymértékben fokozódik a sejtmagban és a citoplazmában is. A korábbi tanulmányokban a SAMDC enzim kloroplasztisz, mitokondriális és citoplazmás aktivitásról számolnak be növényekben és citoplazmás lokalizációról emlősökben. Mivel nem detektáltunk sem kloroplasztisz, sem mitokondriális sGFP jelet, ezért a *FvSAMDC* aminosav szekvenciát TargetP 1.1 alkalmazással vizsgáltuk. A szoftver prediktálása alapján 7% valószínűséggel kloroplasztisz, 9%-kal mitokondriális és 80%, hogy 'egyéb' lokalizációjú.

Mivel a SAMDC inaktív proenzimként szintetizálódik és autokatalízissal aktiválódik, továbbá a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjét random módon több tucat preparátumból is csak néhány alkalommal sikerült megfigyelnünk, ezért azt feltételezzük, hogy ezt a jelenséget a fehérje rövid féléletideje, illetve az enzim szigorú translációs és/vagy poszttranszlációs szabályozása okozhatja. A korábbi kutatások már bizonyították, hogy a *SAMDC* már transzkripciós és poszttranszkripciós szinten is erősen szabályozott.

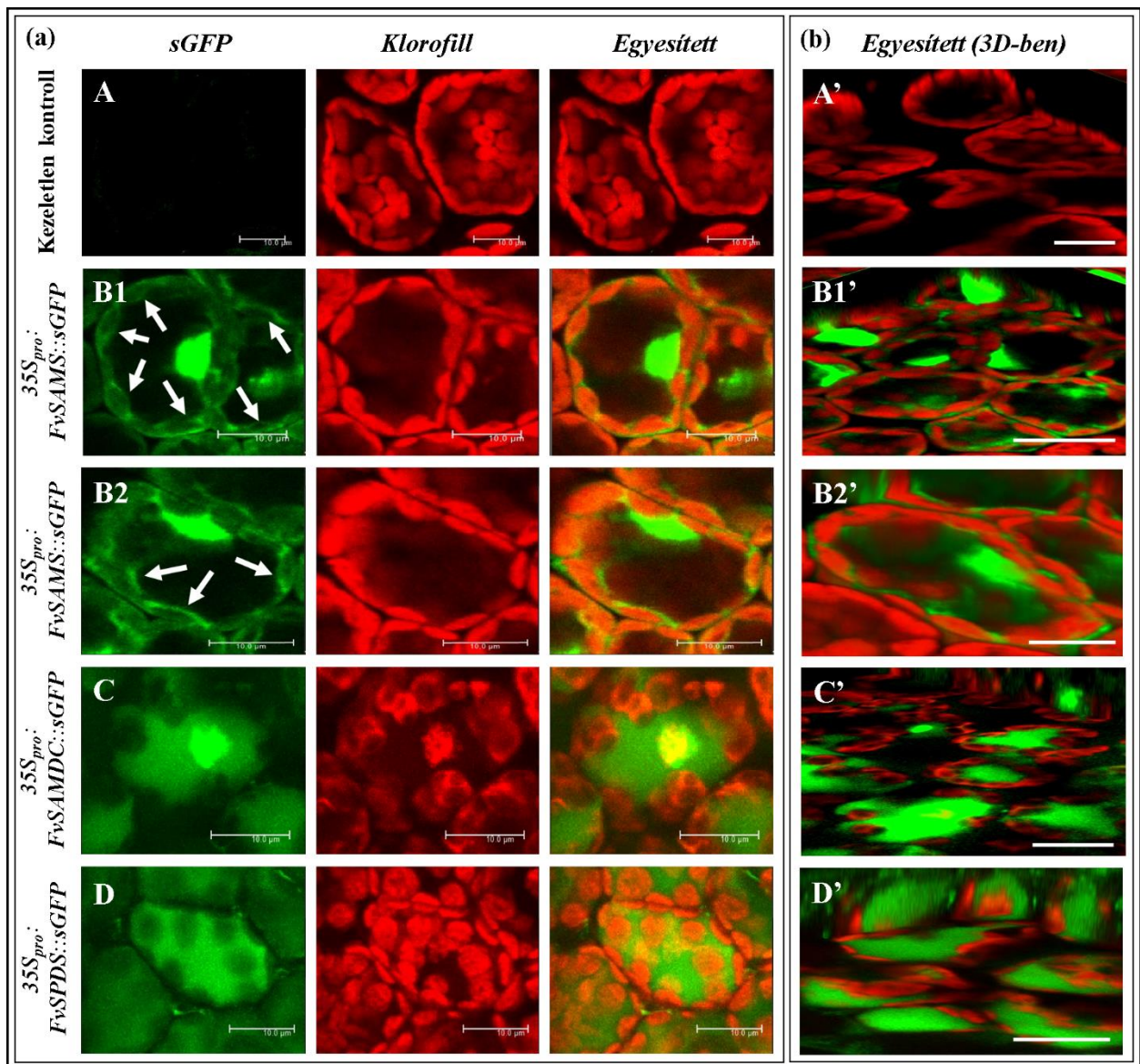
A stabil transzformánsokban megfigyeltük, hogy a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi szubcelluláris lokalizációja a citoplazma irányába tolódik el sóstressz hatására, míg a *FvSAMDC::sGFP* fehérje mennyisége sóstressz esetén egyenes arányban nő mindkét (sejtmag, citoplazma) sejtkompartimentben, ezért meghatároztuk a sGFP relatív fluoreszcens intenzitását (**3. / b ábra**). Ezen az ábrán számszerűsítve látható, hogy a *FvSAMS::sGFP* kontroll körülmények között intenzívebb sejtmagi és sóstressz hatására erősebb citoplazmás jelet generál, míg a *FvSAMDC::sGFP* intenzitás a sóstressz esetén egyenes arányban fokozódik mind a sejtmagban, mind a citoplazmában a kontroll körülmények között mért intenzitáshoz képest.

A *FvSAMS* vonalak esetében arra a jelenségre is figyelmesek lettünk, hogy a *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjének a különböző levélszinteken változott a detektálható mennyisége. Felülről a legfelső levél szinte minden sejtjében észleltük a *FvSAMS::sGFP* fehérjét, lefelé haladva a levélszinteken egyre kevesebb sejtben láttuk az *FvSAMS::sGFP* kifejeződését, míg végül már csak a sztómák zárósejtjeiben kaptunk jelet. Emellett a *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjét nemcsak az idősebb levelek, hanem a magoncok szikleveleiben is csak a sztómák zárósejtjeiben detektáltuk, ezért azt feltételezzük, hogy a sztóma apparátus szabályozásában, azaz

a sejtlégzésben, a fotoszintetikus gázcserében és a párologtatásban is fontos szerepet tölt be a SAMS enzim. Hasonló jelenséget a FvSAMDC vonalak esetében nem figyeltünk meg.



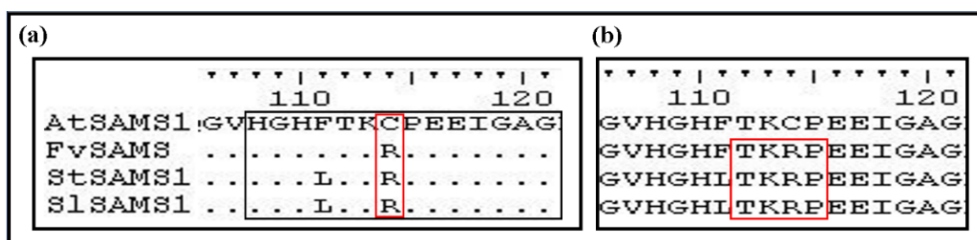
**3. ábra:** A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* expressziós mintázata a stabil transzformánsok oszlopos parenchima sejtjeiben kontroll körülmények között és 10 mM NaCl stressz hatására. A vonal 10 μm-t jelöl (a). A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék relatív fluoreszcens intenzitása a sejtmagban és a citoplazmában kontroll körülmények között és sóstressz hatására. SD±, n=10 (P<0,001), a \*\* a kontrollhoz viszonyítva (b).



**4. ábra:** A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* különböző citoplazmás lokalizációja az oszlopos parenchima sejtekben (A-D). A vonal 10  $\mu\text{m}$ -t jelöl (a). A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* citoplazmás lokalizációja és a vad típusú oszlopos parenchima sejtek 3D-ben (A'-D'). A vonal 20  $\mu\text{m}$ -t jelöl (b). Az ábrán fehér nyilakkal jelöltük a *FvSAMS::sGFP* citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán lokalizációját.

Az idősebb levelekben a csökkent *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérje jel megértéséhez vizsgáltuk a *FvSAMS* transzgenikus vonalak felülről a 1.-4. és az 5.-7. levélszintek *FvSAMS::sGFP* mRNS mennyiségét. Annak ellenére, hogy a felsőbb levélszinteken több sejtben detektáltuk a *FvSAMS::sGFP*-t, mint az alsóbb levélszinteken, a mRNS mennyiségben fordított eredményt kaptunk, vagyis az alsóbb levélszinteken ~2-5-ször nagyobb mennyiségű mRNS-t detektáltunk. Hasonló jelenséget figyeltek meg az *AtSAMS1*-et túltermelő transzgenikus *Nicotiana tabacum* növényekben, ugyanis a levélszinteken felülről lefelé haladva növekedett az *AtSAMS1* mRNS mennyisége, de az *AtSAMS1* enzimaktivitása fordított korrelációban állt a mért mRNS mennyiségekkel. Később bizonyították, hogy az *AtSAMS1* mRNS mennyisége és az

enzimaktivitása közötti fordított korrelációhoz az *AtSAMS1* nitrogénoxid (NO) indukált gátlásának van köze, amit cisztein-114 (Cys-114) aminosav S-nitrolizációjával magyaráztak. Ez a cisztein hiányzik az *AtSAMS2*-ben és az *AtSAMS3*-ban. Az *AtSAMS1* bioinformatikai elemzése azt mutatta, hogy a Cys-114-et a S-nitrozilációt elősegítő aminosavak határolják és a S-nitrozoglutation (GSNO) gátló hatása drasztikusan csökkent, amikor a *AtSAMS1* Cys-114-et argininnel (R) helyettesítették. Mivel a korábbi tanulmányokban és az általunk vizsgált SAMS aminosav szekvenciáján a Cys-114 helyén arginin (R) van (**5. / a ábra**), ezért feltételezésünk szerint a S-nitrolizáción kívül más translzációs és/vagy poszttranszlzációs modifikáció is szerepet játszik a SAMS enzim gátlásában. Egy másik publikáció viszont a SAMS treonin-342 (Thr-342) Protein kináz C (PKC) általi foszforilációról számol be, ami gátolja a SAMS enzimaktivitást, a FvSAMS esetében a prediktált foszforilálható treonin és szerin a Thr-112 és a Ser-271 (**5. / b ábra**, **6. / a ábra**), ami megfelel a PKC által preferált S/TXK/R és a TXRX (FvSAMS esetében TKRP és SGK) felismerő szekvenciáknak, ezért lehetséges, hogy a Thr-112 és Ser-271 foszforilációjának szerepe van a FvSAMS enzimaktivitásának PKC általi gátlásában.



**5. ábra:** Az *AtSAMS1* (NP\_171751.1), a *FvSAMS* (XP\_004288342.1), a *StSAMS1* (NP\_001275609.1), a *SlSAMS1* (NP\_001234425.1) S-nitrolizációs régiója (fekete téglalap) (Lindermayr et al., 2006 alapján) és az S-nitrolizációhoz szükséges cisztein hiánya az általunk vizsgált *FvSAMS*-ben, a Gong et al. (2014) által publikált *SlSAMS1*-ben és a Kim et al. (2015) által publikált *StSAMS1*-ben (piros téglalap). A pontok az *AtSAMS1* szekvenciával való egyezést jelölik (**a**). A prediktált Thr-112 foszforilációs hely és a protein kináz C lehetséges felismerő szekvenciája (piros téglalap) (**b**).

A *FvSAMDC::sGFP* esetében felfigyeltünk arra is, hogy egyidejűleg mutatott külön sejtmagi, külön citoplazmás és külön sejtmagi-citoplazmás lokalizációt. Mivel a *FvSAMDC::sGFP* külön-külön és együtt is adott sejtmagi és citoplazmás jelet, ezért feltételezésünk szerint ez jelentheti a SAMDC proenzim eltérő autokatalitikus aktíválódását a különböző sejtcompartmentekben, illetve feltételezheti az enzim egyirányú mozgását is, azonban ennek a mozgásnak az irányát citoplazma→sejtmag vagy sejtmag→citoplazma nem sikerült azonosítani. A *FvSAMDC::sGFP* duális lokalizációját támaszthatja alá egy korábbi tanulmány is, amelyben leírják, hogy a spermidin szintáz sejtmagi és citoplazmás, míg a spermin szintáz citoplazmás lokalizációt mutatott. Megfigyelték azt is, hogy az exogén spermidin szintáz jelenlétében a spermin szintáz citoplazmás lokalizációja a sejtmag felé tolódik, ami a spermidin és a spermin

szintézisének bonyolult és komplex folyamatára utal. Mivel a SAMDC termeli a dcSAM-ot, ami mind a spermidin szintáz, mind a spermin szintáz számára szubsztrátként szolgál, azaz biztosítja az aminopropil csoportot, így a SAMDC inaktív formában történő szintézise, a szigorú transzkripciós és translációs szabályozása, valamint a rövid félélet ideje magyarázatot adhat a duális lokalizációra a folyamat komplexitása miatt.

A detektált *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán, valamint a *FvSAMDC::sGFP* sejtmagi és citoplazmás lokalizációjának aminosav szintű igazolásához a szekvenciákat különböző bioinformatikai alkalmazásokkal vizsgáltuk. A bioinformatikai elemzést a TargetP 1.1 (tranzit peptid meghatározása) a cNLS Mapper 1.0 (nukleáris lokalizációs szignálok /NLS/ azonosítása), NetNES 1.1 (nukleáris export szignálok /NES/ azonosítása), a PHOSIDA (foszforilációs-, acetilációs- és SUMOilációs helyek azonosítása), a GPS-SNO 1.0 (S-nitrolizációs helyek azonosítása) és a NOD (Nukleoláris lokalizációs szekvenciák azonosítása) alkalmazásokkal végeztük (**6. ábra**). Számos sejtmagi fehérje tartalmaz, mind NLS-eket, mind NES-eket, ezek a szignálok koordinálják a sejtmag-citoplazma közötti transzportot, mivel a FvSAMS és a FvSAMDC szekvenciák is tartalmaznak bipartit (kétrétű) nukleáris lokalizációs- és nukleáris export szignálokat, ezért a prediktált adatok alátámasztják mindkét enzim sejtmagi és citoplazmás lokalizációját. Korábbi tanulmány alapján a SAMS enzim szubcelluláris lokalizációját C-terminális doménjének struktúrája határozza meg, így a prediktált bioinformatikai adatok szerint a FvSAMS enzim szubcelluláris lokalizációját a Lys-335, 360, 364 acetilációja és a Lys-387 SZUMOilációja szabályozhatja. Ezt a hipotézist korábbi tanulmányok is alátámaszthatják, mivel a humán SAE (SUMO Activating Enzyme Subunit 1) enzim NLS-ének SZUMOilációja az enzim sejtmagi- (Truong et al., 2012), míg a humán RhoA GEF Net1A (RhoA guanine nucleotide exchange factor neuroepithelial transforming1A) NLS-ének acetilációja a citoplazmás felhalmozódást fokozza (Song et al., 2015). A SAMDC fehérje esetében nem áll rendelkezésünkre adat az enzim szubcelluláris lokalizációját meghatározó poszttranszlációs módosításról, ezért a prediktált adatok alapján a Ser-25, 37, 39, 203, 204, 212, 316, 317 foszforilációja, a Lys-199 acetilációja, a Cys-312 S-nitrolizációja és a Lys-334 SZUMOilációja jöhet számításba a poszttranszlációs módosítások közül, mivel már számos korábbi tanulmány számolt be arról, hogy a NLS-ek foszforilációja, acetilációja, S-nitrozilációja, SZUMOilációja szabályozhatja az enzimek szubcelluláris lokalizációját (Harreman et al., 2004; Hara et al., 2005; Truong et al., 2012; Song et al., 2015).

(a)

**FvSAMS**

→  
METFLETS<sup>★</sup>ESVNE<sup>★</sup>EGHPDKL<sup>★</sup>CDQI<sup>★</sup>SDAVLDACLEQDPD<sup>★</sup>SVACETCTKTNMVMVFGEITTKAN  
VDYE<sup>★</sup>KIVRDTCRNIGFVSD<sup>★</sup>DDVGLDADNCKVLV<sup>★</sup>NIEQ<sup>★</sup>QSPDIAQGVHGHF<sup>★</sup>TKRPEEI<sup>★</sup>GAGDQ<sup>★</sup>G  
HMF<sup>★</sup>GYATDETPELMPLSHVLAT<sup>★</sup>KL<sup>★</sup>GAKL<sup>★</sup>TEVRKNGTCAWL<sup>★</sup>RPDGKTQVTVEYHNEGGAMVPL  
RVHTVLISTQHD<sup>★</sup>ETVTNDEIAADLKEHVIKPVVPE<sup>★</sup>KYLDE<sup>★</sup>KTIFHLNPSGRFVI<sup>★</sup>GPGHDAG  
LTGRKIIIDTYGGWGAHGGGAF<sup>★</sup>SGKDP<sup>★</sup>TKVDRS<sup>★</sup>GAYIVRQA<sup>★</sup>AKS<sup>★</sup>IVANGLARRALVQVSYAI  
GVPEPL<sup>★</sup>SVFVETYGTG<sup>★</sup>KIPDKEIL<sup>★</sup>KIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGN<sup>★</sup>KRFL<sup>★</sup>KTAA<sup>★</sup>YGHFG  
RDDP<sup>★</sup>DF<sup>★</sup>TWEVVKPL<sup>★</sup>RWEK<sup>★</sup>PQS

(b)

**FvSAMDC**

MSMAGSAIGFEGYEKRL<sup>★</sup>EIAFFEPS<sup>★</sup>VFRDPEGRGLR<sup>★</sup>SL<sup>★</sup>SKS<sup>★</sup>QLDEFLGQAECTIVSSLSNDD  
VDSYVLSESSLFIYSYKLI<sup>★</sup>IKTC<sup>★</sup>G<sup>★</sup>TKLL<sup>★</sup>LAIP<sup>★</sup>PILKLAESIGLTVRSVRYTRGSFIFPGAQ  
SFPHRN<sup>★</sup>FSEEV<sup>★</sup>STL<sup>★</sup>DAYFG<sup>★</sup>KLGG<sup>★</sup>SRAYMMGGSAGPQKWHVYSASAEP<sup>★</sup>HLVDPVY<sup>★</sup>TLEMCM  
TGLDRAKASV<sup>★</sup>FYK<sup>★</sup>TVT<sup>★</sup>SSAAAM<sup>★</sup>TNDS<sup>★</sup>GIRKIL<sup>★</sup>PGSDICDFEFDPCGYSMNAIEGAAISTIHV  
TPEDGF<sup>★</sup>SYAS<sup>★</sup>FES<sup>★</sup>AGYDFN<sup>★</sup>ELN<sup>★</sup>LNQLAERVLACFKPSEFS<sup>★</sup>IAVHADVA<sup>★</sup>VKSLQ<sup>★</sup>QIC<sup>★</sup>SLDLKG  
Y<sup>★</sup>CREE<sup>★</sup>SS<sup>★</sup>HEEL<sup>★</sup>GMGGSIVQYRFL<sup>★</sup>TEACGSPRS<sup>★</sup>TLKGCWKEEDEDYESS

**6. ábra:** A FvSAMS (a) és a FvSAMDC (b) aminosav szekvenciák bioinformatikai elemzése a cNLS Mapper 1.0, a NetNES 1.1, a NOD, a PHOSIDA és a GPS-SNO 1.0 alkalmazások felhasználásával. Jelölések: a prediktált bipartit NLS (piros betű), a prediktált S-nitrozilációs hely (sárga kiemelés, ahol átfedés van dőlt, nem félkövér betű), a prediktált foszforilációs hely (türkizzel kiemelve), a prediktált acetilációs hely (kék betű), a prediktált SZUMOilációs hely (zölddel kiemelve), a prediktált NLS-ek és a poszttranszlációs módosító helyek egybeesése (csillag). FvSAMS esetében a N-terminális domént (kék nyíl), Centrális domént (fehér nyíl) és a C-terminális domént (piros nyíl) jelöli az UniProtKB - Q96551 alapján.

## Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy a *FaSAMS* és a *FaSAMDC* változó expressziót mutat a *Fragaria x annanassa* Duch. cv. Asia szamóca gyümölcs érése során.
2. Bizonyítottuk, hogy a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése fokozta a transzgénikus *Nicotiana benthamiana* vonalak sótoleranciáját a vad típushoz képest.
3. A *FvSAMDC* vonalakban mért adatok alapján megállapítottuk, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására.
4. Az egy kísérleti rendszerben történő vizsgálat alapján mi írjuk le először, hogy a kontroll körülmények között mért prolin-, valamint a kontroll és sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével a *FvSAMDC* túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgénikus vonalak növényélettani paramétereit kontroll körülmények és 10 mM NaCl stressz hatására is, mint a *FvSAMS* overexpressziója.
5. Növényekben mi írjuk le először, hogy a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán, szubcelluláris lokalizációt mutat, ami arra utal, hogy a SAM számos bioszintézishez *in situ* termelődik (pl.: a genomi DNS, RNS, fehérjék metilálásához; a kloroplaszt DNS, RNS, RUBISCO enzim metilálásához; a lignin bioszintézishez és a riboszómák bioszintéziséhez).
6. Mi írjuk le először a *FvSAMDC::sGFP* sejtmagi lokalizációját.



## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Bizonyítottuk, hogy a *FaSAMS* és a *FaSAMDC* változó expressziót mutatott a szamóca gyümölcs érése során, ami az érésben betöltött szerepét támasztja alá, továbbá a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése fokozta a transzgénikus vonalak sótoleranciáját is a vad típushoz képest, ami a sótolerancia kialakításában betöltött funkcióját bizonyítja. Feltehetően mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMDC* túltermeltetése csökkenti a  $\text{Na}^+$  toxicitását és fokozza a membránok stabilitását, mivel korábbi publikációkban leírják, hogy a poliaminok a pozitív töltésük miatt blokkolni tudják a kationcsatornákat. Feltehetően a csökkent  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\text{O}_2^-$  mennyiséget is a nagyobb mennyiségű poliaminok okozhatták közvetve a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermelő vonalakban, mivel korábbi irodalmi adatok alapján a poliaminok fokozzák az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását. A *FvSAMDC* vonalakban mért adatok alapján úgy tűnik, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és a lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására. A méréseink alapján kontroll körülmények között mind a ‘SAM hiány’, mind a ‘SAM többlet’ fokozta a lignifikációt a transzgénikus vonalakban, azonban sóstressz hatására a ‘SAM hiány’ jelentős mértékben redukálta, míg a ‘SAM többlet’ jelentősen fokozta a lignin felhalmozódását, ami közvetlen módon növelhette a *FvSAMS* vonalak sóstressz elleni toleranciáját. Számos korábbi tanulmánnyal ellentétben az etilén és a poliamin bioszintézis nem volt antagonistá hatással egymásra az általunk vizsgált kísérleti rendszerben. Feltételezésünk szerint a nagyobb mértékű sótoleranciát a *FvSAMS* vonalakban az emelkedett össz szabad poliamin tartalom és a fokozott mennyiségű lignin, míg a *FvSAMDC* vonalak esetében a jelentős mértékben emelkedett össz szabad poliamin és a nagyobb etilén tartalom okozta. Ezt támaszthatja alá a 300 mM NaCl stressznek kitett levélkorongok esetében kapott relatív klorofill tartalom is, ugyanis a stresszt követő 24 óra elteltével a *FvSAMS* vonalakban a klorofill degradáció fele akkor volt, mint a *FvSAMDC* vonalakban, amit feltételezésünk szerint a *FvSAMS* vonalak fokozott lignin tartalmának mechanikai védelme okozta. Ezek az értékek a kezelést követő 48-, 72- és 96 óra elteltével kiegyenlítődtek, ami a *FvSAMDC* vonalak esetében feltételezésünk szerint a fokozott poliamin tartalommal volt összefüggésben. Összeségében megállapítható, hogy a kontroll körülmények között mért prolin és a kontroll és sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével, a *FvSAMDC* túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgénikus vonalak élettani paramétereit a kontroll körülmények között és a sóstressz hatására is, mint a *FvSAMS* overexpressziója.

A *FvSAMS::sGFP* citoplazma plazmalemma környéki, kloroplaszt plazmamembrán, sejtmagi és sejtmagvacska szubcelluláris lokalizációja arra utal, hogy a SAM számos bioszintézishez *in situ* termelődik (pl.: a genomi DNS, RNS, fehérjék metilálásához; a kloroplaszt

DNS, RNS, RUBISCO enzim metilálásához; a lignin bioszintézishez és a riboszómák bioszintéziséhez).

A megfigyeléseink alapján csökkent a detektálható *FvSAMS::sGFP* mennyisége az alsóbb levélszinteken, ugyanakkor a *FvSAMS* mRNS mennyisége ~2-5-ször nagyobb volt az alsóbb levelekben, ezért bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk a *FvSAMS* poszttranszlációs módosításában szerepet játszó aminosav származékokat. Egy korábbi tanulmányban a SAMS enzim S-nitrolizáció általi gátlásáról számolnak be, de a *FvSAMS* aminosav szekvenciáján hiányzott a S-nitrolizációhoz szükséges cisztein-114, ezért feltételezésünk szerint a S-nitrolizáción kívül más transzlációs és/vagy poszttranszlációs modifikáció is szerepet játszik a SAMS enzim gátlásában. Egy másik publikáció alapján, a Thr-342 Protein kináz C (PKC) általi foszforilációja gátolja a SAMS enzimaktivitását, a *FvSAMS* esetében a prediktált foszforilálható treonin és szerin a Thr-112 és a Ser-271, ami megfelel a PKC által preferált S/TXK/R és a TXRX (*FvSAMS* esetében TKRP és SGK) felismerő szekvenciáknak, ezért feltételezésünk szerint a Thr-112 és a Ser-271 foszforilációjának szerepe lehet a *FvSAMS* enzimaktivitásának PKC általi gátlásában. Ennek bizonyításához olyan deléciós vektorkonstrukciókat kellene létrehozni, amik pontmutációt tartalmaznak a Thr-112 és a Ser-271 aminosav helyén, ezáltal aminosav váltást okoznak. Ezek specifikus primerek tervezésével megoldhatók, így protoplaszt rendszerben transziens expresszióval és a foszforiláció indukálásával vizsgálható lenne, hogy valóban ezek az aminosav származékok játszanak-e szerepet a *FvSAMS* enzim poszttranszlációs gátlásában.

A *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjét az idősebb levelekben és a magoncok szikleveleiben is csak a sztómák zárósejtjeiben detektáltuk, ezért azt feltételezzük, hogy a SAMS enzim fontos szerepet tölt be a sztóma apparátus szabályozásában, azaz a sejtlélegzésben, a fotoszintetikus gázcserében és a párologtatásban.

Korábbi tanulmányok alapján a SAMS enzim szubcelluláris lokalizációját C-terminális doménjének struktúrája határozza meg, a bioinformatikai elemzés alapján a *FvSAMS* enzim esetében a Lys-335, 360, 364 acetilációja és a Lys-387 SZUMOilációja játszhat szerepet az enzim szubcelluláris lokalizációjában. Ennek bizonyításához hasonló deléciós vektorkonstrukciókat kellene előállítani, mint a *FvSAMS* enzim gátlásában szerepet játszó aminosav származékok esetében, így vizsgálható lenne, hogy valóban ezek az aminosavak felelősek-e a *FvSAMS* enzim szubcelluláris lokalizációjában.

A *FvSAMDC::sGFP* esetében felfigyeltünk, hogy egyidejűleg mutatott külön sejtmagi, külön citoplazmás, külön sejtmagi és citoplazmás lokalizációt egyszerre. Mivel a *FvSAMDC::sGFP* külön-külön és együtt is mutatott sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, ami jelentheti a SAMDC proenzim eltérő autokatalitikus aktiválódását a különböző sejt-kompartmentekben, illetve az enzim egyirányú mozgását is feltételezheti, azonban ennek a

mozgásnak az irányát citoplazma→sejtmag vagy sejtmag→citoplazma nem sikerült azonosítani. A *FvSAMDC::sGFP* duális lokalizációját támaszthatja alá egy korábbi tanulmány is, amelyben leírják, hogy a spermidin szintáz sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, míg a spermin szintáz citoplazmás lokalizációt mutatott. Ebben a tanulmányban azt is megfigyelték, hogy az exogén spermidin szintáz jelenlétében a spermin szintáz citoplazmás lokalizációja a sejtmag felé tolódott, ami a spermidin és a spermin szintézisének bonyolult és komplex folyamatára utal. Mivel a SAMDC termeli a dcSAM-ot, ami mind a spermidin szintáz, mind a spermin szintáz számára szubsztrátként szolgál, azaz biztosítja az aminopropil csoportot, így a SAMDC inaktív formában történő szintézise, a szigorú transzkripciós és translációs szabályozása, valamint a rövid félélet ideje magyarázatot adhat a duális lokalizációra a folyamat komplexitása miatt. Ennek a vizsgálata történhet protoplaszt rendszerben tranziens expresszióval, exogén spermidin és spermin adagolásával, ami magyarázatot adhat a *FvSAMDC* duális lokalizációjára, illetve indukálhatóságára vagy gátlására.

## PUBLIKÁCIÓK

### Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

#### Tudományos cikkek (angol nyelvű)

1. **László Kovács**, Ákos Mendel, Anna Szentgyörgyi, Sándor Fekete, Ferenc Söre, Katalin Posta and Erzsébet Kiss (2018). Comparative analysis of overexpressed *Fragaria vesca* S-adenosyl-L-methionine synthase (*FvSAMS*) and decarboxylase (*FvSAMDC*) during salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana*. **Frontiers in Plant Science**, (közlésre beküldve). **IF: 3,678**
2. Ákos Mendel, **László Kovács**, Anna Szentgyörgyi, Sándor Fekete, Katalin Posta and Erzsébet Kiss (2018). Expression patterns of ethylene and polyamines biosynthetic genes during fruit ripening in strawberry. **Turkish Journal of Biology**, (közlésre beküldve). **IF: 0,651**
3. Polgári D., Kalapos B., Tisza V., **Kovács L.**, Kerti B., Heszky L., Kiss E. 2010. *In silico* analysis of a putative *Spiral* gene related to strawberry ripening. **Acta Agronomica Hungarica**, 58 (3): 267-272 ISSN: 0238-0161.
4. Tisza V., **Kovács L.**, Balogh A., Heszky L., Kiss E. 2010. Characterization of FaSPT, a Spatula gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48: 822-826 ISSN: 0981-9426. **IF: 2,485**
5. Tisza V.\*, **Kovács L.\***, Heszky L., Kiss E. 2009. Ripening related processes in strawberry, a non climacteric fruit: a short overview. **International Journal of Horticultural Science**, 15 (1-2): 105-109, \*: **These two authors contributed equally to this work.**

#### Tudományos cikkek (magyar nyelvű)

6. **Kovács L.**, Mendel Á., Kiss E. 2015. A málna (*Rubus idaeus* L.) és a fekete eperfa (*Morus nigra* L.) spermidin-szintáz gén szekvenciájának meghatározása. **Kertgazdaság**, 47 (2): 72-78.

#### Konferencia kiadvány (magyar nyelvű)

7. **Kovács L.**, Mendel Á., Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E. 2014. *Fragaria vesca* Sam DC1 gén funkcionális jellemzése. XX. Növénynevelési Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Székháza, Budapest, 2014: Összefoglalók. p. 254-258.
8. Mendel Á., **Kovács L.**, Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E. 2014. *Fragaria vesca* S-adenozilmetionin szintáz gén (SAM-Sy) funkcionális jellemzése. XX. Növénynevelési

Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Székháza, Budapest, 2014: Összefoglalók. p. 299-303.

9. **Kovács L.**, Tisza V., Koncz T., Kerti B., Szőke A., Heszky L., Kiss E. 2009. A szamóca (*Fragaria* × *Ananassa* Duch.) ACC-szintáz gén promóterének bioinformatikai jellemzése. Hagyomány és haladás a növénynevelésben. *XV. Növénynevelési Tudományos Napok*. 2009. március 17. Budapest. p. 262-266 ISBN: 978-963-508-575-0.
10. Mendel Á., **Kovács L.**, Tóth Sz., Kiss E. 2013. A szamóca poliamin metabolizmusában működő SAM-dekarboxiláz és SAM-szintáz gének promótereinek izolálása és jellemzése. Gazdálkodás és Menedzsment Tudományos Konferencia, 2013. szeptember 5., Kecskemét, ISBN 978-615-5192-19-7, p. 208-212.

#### **Konferencia és előadás összefoglalók (angol nyelvű)**

11. **Kovács L.**, Mendel Á., Szentgyörgyi A., Kiss E. 2016. Overexpression of *Fragaria vesca* SAM-synthase1 and SAM-decarboxilase1 proteins in *Nicotiana benthamiana*. Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK) 2016. Program és Összefoglalók, p-93.
12. **Kovács L.**, Mendel Á., Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E. and Toldi O. 2015. Increased SAM pool and PA/Ethylene ratios in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants resulted in marked changes in salt tolerance, protein content and biomass production. Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Eger, 2015. március 27-29.: Összefoglalók: P-142, ISBN: 978-615-5270-15-4.
13. Tóth Sz., **Kovács L.**, Mendel Á., Szentgyörgyi A., Kiss E. and Toldi O. 2015. Overexpression of a heterologous polyamine oxidase, involved in polyamine catabolism, activates both necrotic and vacuolar programmed cell death in tobacco. Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Eger, 2015. március 27-29.: Összefoglalók: O-054, ISBN: 978-615-5270-15-4.
14. Mendel Á., **Kovács L.**, Hidvégi N., Kiss E. 2013. Isolation and characterization of promoters of genes involved in polyamine metabolism in strawberry. Hungarian Molecular Life Sciences 2013: programme & book of abstracts. 287 p. ISBN: 978-615-5270-02-4.
15. **Kovács L.**, Koncz T., Tisza V., Galli Zs., Kerti B., Szőke A., Balogh A., Kiss E., Heszky L. 2008. Ripening and tissue-specific promoters in strawberry. Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants, International Conference, Vienna 3-6 February 2008. Programme and Abstracts p. 95.

16. Hidvégi N., **Kovács L.**, Szőke A., Tisza V., Gulyás A., Dénes F., Heszky L., Kiss E. 2012. Characterization of FaSPT gene and promoter in strawberry fruit. (19th Eucarpia general congress) p. 309.

### **Konferencia és előadás összefoglalók (magyar nyelvű)**

17. Szentgyörgyi A., Mendel Á., **Kovács L.**, Kiss E. 2017. A szamóca S-adenozil-L-metionin szintáz (SAMS) enzimet kódoló gén expressziójának vizsgálata és a SAMS fehérje lokalizációjának meghatározása. XXIII. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA, 2017. március 7., Összefoglalók. 147., ISBN: 978-963-8351-44-9.
18. Tóth Sz., **Kovács L.**, Mendel Á., Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. 2015. A poliamin (PA) lebontásában résztvevő heterológ PA-oxidáz növeli a stressz-érzékenységet transzgénikus dohányban a PA szint csökkentése nélkül. XXI. Növénynevelési Tudományos Napok, Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ, Martonvásár, 2015. március 11-12, Összefoglalók. 48., ISBN: 978-963-8351-43-2.
19. **Kovács L.**, Mendel Á., Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. 2015. A szenescencia indukciója és késleltetése a poliamin/etilén arány változtatásával transzgénikus *Nicotiana benthamiana* növényekben. XXI. Növénynevelési Tudományos Napok, Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ, Martonvásár, 2015. március 11-12., Összefoglalók. 96., ISBN: 978-963-8351-43-2.
20. Mendel Á., **Kovács L.**, Hidvégi N., Kiss E. 2013. A szamóca poliamin metabolizmusában működő gének promótereinek izolálása és jellemzése. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap. Összefoglalók. p. 118. ISBN 978-963-9639-50-8
21. **Kovács L.**, Koncz T., Tisza V., Kerti B., Szőke A., Kiss E., Heszky L. 2009. Érés- és szövetspecifikus gének promótereinek izolálása TAIL-PCR alkalmazásával szamócából. *Fiatalkutatók az élhető Földért*. ISBN 963993502-6. p. 50.
22. **Kovács L.**, Koncz T., Tisza V., Kerti B., Szőke A., Kiss E., Heszky L. 2009. Szamóca érésében működő ACC-szintáz gén promóterének bioinformatikai jellemzése. *Fiatalkutatók az élhető Földért*. ISBN 963993502-6. p. 49.
23. Tisza V., **Kovács L.**, Koncz T., Kalantidis K., Szőke A., Kiss E., Heszky L. 2009. Szamócából származó nitriláz-gén funkcionális elemzése. *Fiatalkutatók az élhető Földért*. 50. ISBN 963993502-6.
24. Tisza V., Balogh A., **Kovács L.**, Kriton K., Heszky L., Kiss E. 2008. *Fragaria × ananassa* Duch. nitriláz-szerű génjének funkcionális vizsgálata. XIV. Növénynevelési

Tudományos Napok, XIV. Scientific Days of Plant Breeding. Budapest, MTA 2008. március 12. Összefoglalók, p. 78.

### **Az értekezés témaköréhez közvetlenül nem kapcsolódó tudományos publikációk**

#### **Tudományos cikkek (angol nyelvű)**

25. Toldi O., Tóth-Lencsés K., **Kovács L.**, Tóth Zs., Mendel Á., Kerekes A., Gyulai G. 2014. The frequency of genetic rearrangements during carrot (*Daucus carota*) somatic embryogenesis is dependent on 2,4-D levels and diminished in its absence. **COLUMELLA**, Vol. 1 No.2 (2014), p. 109-118.

#### **Tudományos cikkek (magyar nyelvű)**

24. Kerti B. G., **Kovács L.**, Veres A., Kiss E. 2012. Szamócafajták SSR genotípusának meghatározása hat lokuszban. **Kertgazdaság**, 44: (1): 70-77.
25. Wichmann B., Galli Zs., Szabó T., **Kovács L.**, Heszky L., Kiss E. 2010. Alma kereskedelmi és tájfajták elkülönítése európai standard SSR markerekkel. **Kertgazdaság**, 42 (1): 68-75.

#### **Könyv, -részlet, szerkesztés**

##### **Könyvrészlet (angol nyelvű):**

26. Alzohairy A. M., Gyulai G., Amin I. I., **Kovács L.**, Elazma M. H., Elsayw H., Youssef K., Elhamamsy A. R., Ibrahim H. M. M. and Bahieldin A. PLANT GENETICS BIOTECHNOLOGY and FORESTRY (Ed. Gyulai G.), 2016. Chapter 4. DNA methylation - Epigenetics of gene expression through DNA methylation in Human and plant genomes. ISBN: 978-963-269-580-8.
27. Toldi O., Sorvari O., Tóth-Lencsés K., **Kovács L.**, Kerekes A., Mendel Á., Tóth Zs., Gyulai G. 2015. Life history barcoding of carrot. In. Ali M. A., Gyulai G., Al-Hemaid F. (Eds) Plant DNA barcoding and phylogenetics. LAP Lambert Academic Publ. Germany. Chapter 14. pp. 227-240. ISBN-13: 978-3-659-28095-5. ISBN-10: 365928095X. EAN: 9783659280955.

## IRODALOMJEGYZÉK

- ÁBRAHÁM E., HOURTON-CABASSA C., ERDEI L. AND SZABADOS L. (2010). Methods for determination of proline plants. R. Sunkar (ed.), *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology*, 639: 317-331.
- CLEMENTE T. (2006). *Nicotiana (Nicotiana tobaccum, Nicotiana benthamiana)*. *Methods in Molecular Biology*, 343:143-154.
- EMANUELSSON O., BRUNAK S., GUNNAR VON HEIJNE AND NIELSEN H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols*, 2: 953-971.
- GNAD F., GUNAWARDENA J. AND MANN M. (2011). PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Research*, 39: 253–260.
- KOSUGI S., HASEBE M., TOMITA M. AND YANAGAWA H. (2009). Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 10171-10176.
- KUMAR D., YUSUF M. A., SINGH P., SARDAR M. AND SARIN N. B. (2014). Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *Bio-protocol*, 4: 1108.
- LA COUR T., KIEMER L., MØLGAARD A., GUPTA R., SKRIVER K. AND BRUNAK S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17 (6): 527-536.
- LANGEBARTELS C., KERNER K., LEONARDI S., SCHRAUDNER M., TROST M., HELLER W. AND SANDERMANN H. JR. (1991). Biochemical plant responses to ozone: I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis of tobacco. *Plant Physiology*, 95: 882-889.
- LI X. (2011). Infiltration of *Nicotiana benthamiana* protocol for transient expression via *Agrobacterium*. *Bio-protocol*, 101: e95.
- MCCURDY R. D., MCGRATH J. J. AND MACKAY-SIM A. (2008). Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 12: 15-24.
- MOREIRA-VILAR F. C., SIQUEIRA-SOARES R. DE C., FINGER-TEIXEIRA A., MATIAS DE OLIVEIRA D., ANA PAULA FERRO A. P., JACKSON DA ROCHA G., MARIA DE LOURDES L. FERRARESE, DANTAS DOS SANTOS W. AND FERRARESE-FILHO O. (2014). The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin



- in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. PLOS ONE, 9 (10): e110000.
- NÉMETH M. JANDA T., HORVÁTH E., PÁLDI E. AND SZALAI G. (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Science, 162: 569-574.
- PORRA R. J., THOMPSON W. A. AND KRIEDEMANN P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 975: 384-394.
- RIZHSKY L., HALLAK-HERR E., VAN BREUSEGEM F., RACHMILEVICH S., BARR J. E., RODERMEL S., INZÉ D. AND MITTLER R. (2002). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. Plant Journal, 32: 329-342.
- SCHNEIDER C.A., RASBAND W.S. AND ELICEIRI K.W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". Nature Methods, 9: 671-675.
- SCOTT M. S., TROSHIN P. V. AND BARTON G. J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. BMC Bioinformatics, 12: 317.
- SHULAEV V., SARGENT D. J., CROWHURST R. N., MOCKLER T. C., FOLKERTS O., DELCHER A. L., JAISWAL P., MOCKAITIS K., LISTON A., MANE S. P. et al (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics, 43:109-116
- SMITH M. A. AND DAVIES P. J. (1985). Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by High Performance Liquid Chromatography of their dansyl derivatives. Plant Physiology, 78: 89-91.
- VELIKOVA V., YORDANOV I. AND EDREVA A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151: 59-66.
- WARTON K., FOSTER N. C., GOLD W. A. AND STANLEY K. K. (2004). A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. Gene, 342: 85-89.
- XUE Y., LIU Z., GAO X., JIN C., WEN L., YAO X. AND REN J. (2010).GPS-SNO: Computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. PloS One, 5: e11290.