

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM, TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
NÖVÉNYÉLETTANI ÉS MOLEKULÁRIS NÖVÉNYBIOLÓGIAI TANSZÉK,  
BIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

A POLIAMIN TRANSZPORTEREK SZEREPE A  
BETYÁRKÓRÓ (*CONYZA CANADENSIS*/L./ CRONQ.)  
PARAQUAT-REZISZTENCIÁJÁBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS  
JÓRI BALÁZS KÁROLY

DOKTORI PROGRAM:  
KÍSÉRLETES NÖVÉNYBIOLÓGIA

A BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE:  
DR. ERDEI ANNA, CMHAS,  
EGYETEMI TANÁR

PROGRAMVEZETŐ:  
DR. SZIGETI ZOLTÁN, DSc,  
EGYETEMI TANÁR

TÉMAVEZETŐ:  
DR. LÁSZTITY DEMETER, CSc,  
EGYETEMI DOCENS

2010

# TARTALOM

|  |    |
|--|----|
| Bevezetés.....   | 2  |
| Irodalmi áttekintés .....  | 4  |
| Célkitűzések.....  | 27 |
| Anyag és módszer.....  | 28 |
| A növények nevelése.....   | 28 |
| A növények kezelése.....   | 28 |
| Funkcionális aktivitás mérése.....   | 28 |
| Dezoxi-ribonukleinsav kinyerése.....   | 29 |
| Ribonukleinsav kinyerése.....  | 29 |
| Reverz transzkripció, cDNS készítése.....  | 30 |
| Differential-display-RT-PCR.....   | 30 |
| A fragmentek elválasztása és visszaizolálása.....  | 30 |
| A fragmentek klónozása és szekvenálása.....  | 31 |
| Primertervezés.....  | 31 |
| PCR reakció.....   | 32 |
| Szemikvantitatív RT-PCR reakció.....   | 32 |
| <i>In silico</i> elemzések.....  | 33 |
| Eredmények.....  | 34 |
| DDRT-PCR.....  | 34 |
| CAT-homológ.....   | 36 |
| Poliamin transzporterek <i>in silico</i> vizsgálata.....   | 37 |
| Direkt szekvenálás.....  | 42 |
| Transzporter-inhibitor (KNO <sub>3</sub> ) alkalmazása.....  | 45 |
| A teljes ferritin szekvencia meghatározása és elemzése.....  | 47 |
| A génextenzív változások megerősítése szemikvantitatív RT-PCR technikával.....                     | 52 |
| Eredmények megvitatása.....  | 53 |
| Függelék.....  | 60 |
| 1.számú függelék: Adatbázis azonosítók listája.....  | 60 |
| 2. számú függelék: Transzmembrán domének és putreszinkötőhelyek <i>in silico</i> előrejelzése..... | 61 |
| 3.számú függelék: Ferritin szekvencia.....   | 67 |
| Irodalomjegyzék.....   | 68 |
| Rövidítések jegyzéke.....  | 74 |
| Összefoglalás.....   | 76 |
| Summary.....   | 78 |
| Köszönetnyilvánítás.....   | 80 |
| Az értekezéshez kapcsolódó közlemények jegyzéke.....   | 81 |
| Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:.....  | 81 |
| További tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:.....   | 81 |
| Referált tudományos folyóiratokban megjelent konferencia kivonatok:.....                           | 81 |
| Összefoglalók konferencia kiadványokban:.....  | 81 |
| További kapcsolódó publikációk.....  | 81 |

## BEVEZETÉS

Az elmúlt évszázadok során a mezőgazdaság és a szolgálatában álló tudományok megkísérelték a lehető legjobban hasznosítani a biológiai rendszereket, hogy így az ipari méreteket öltött növénytermesztés kielégítthesse az egyre növekvő fogyasztási igényeket. A hagyományos növénynemesítési eljárásokat egyre inkább a genomok ismeretét felhasználó molekuláris módszerek váltják fel, emellett kiemelt szerep jut a haszonnövények életterét beszűkítő, hozamukat csökkentő herbivorok, paraziták és gyomnövények elleni vegyszeres küzdelemnek.

A gyomnövények ellen a világon legszélesebb körben alkalmazott herbicidek egyike a paraquat. Bár a bipiridil típusú vegyületet laboratóriumi redoxreakciók indikátoraként a XIX. század vége óta használják (metil-viologén néven), posztemergens, nem szelektív, kontakt gyomirtó hatását csak 1955-ben szabadalmaztatták. A levélherbicidet kezdetben haloid sók formájában, 1962 óta szerkombinációkban hozták forgalomba (Paraquat Information Center [www.paraquat.com](http://www.paraquat.com)).

Kiterjedten használták szőlőültetvények, gyümölcsösök totális gyomtalanítására, de ipari növények érését elősegítő defoliáns szerként is. Népszerűségét széles spektrumú és gyors hatásának köszönhetette és a kezelés eredményessége csupán korlátozott mértékben függ időjárási tényezőktől: a permetezés után pár órányi napfényes időszakot követel meg. Használatakor utólagos környezeti károkkal nem kellett számolni, mert a herbicid a talajszemcsékhez rendkívül gyorsan és irreverzibilis módon kötődik, biológiailag inaktíválódik. Lebomlása akár több évig eltarthat (Ross és Krieger, 1980), a talajvízbe csak igen kis mértékben mosódik (Rial-Otero et al, 2006).

A szer intenzív használata következtében a hetvenes évektől a mezőgazdaság számára problémát jelentettek az egyre gyakrabban megjelenő, paraquattal szemben toleráns és rezisztens gyomfajok. Az első rezisztens fajok leírását követő harmincöt év alatt mára közel harminc növényfajban alakult ki az ellenálló képesség a herbiciddel szemben, (Ryan, 1970, HRAC, [www.hracglobal.com](http://www.hracglobal.com)) melyek közül kimagasló mértékű rezisztenciát tapasztaltak a betyárkóró (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.) magyarországi populációjában.

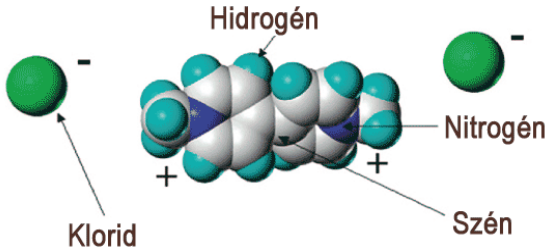
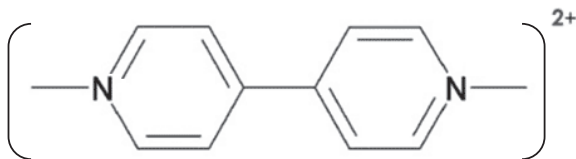
A rezisztencia-mechanizmus leírására több elképzelést is leírtak, mindezüig azonban egyiket sem sikerült bizonyítani. (Norman et al, 1993, Szigeti 2000).

Munkám során – melynek célja a paraquat-rezisztencia mechanizmusának megértése volt – a klasszikus növényélettani módszerek mellett modern, molekuláris biológiai és *in silico*, számítógépes elemzéseket is alkalmaztam annak érdekében, hogy a komplexebb megközelítés lehetővé tegye a folyamatok jobb megértését.

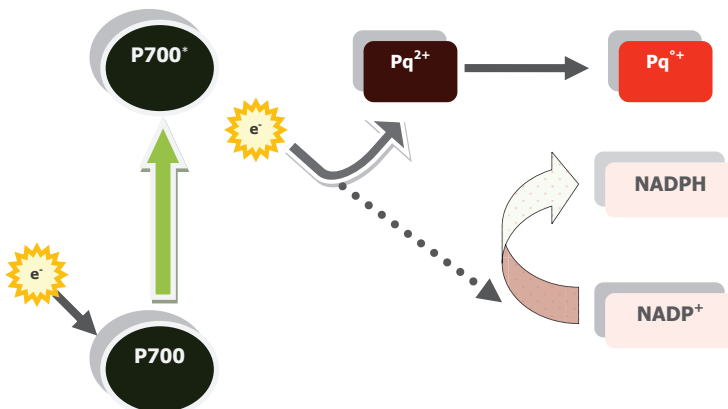
A rezisztenciamechanizmus leírása nem csupán elméleti szempontból fontos. A folyamat feltárása stratégiai jelentőségű lehet az eddig ismert herbicidek újszerű megközelítésből eredő, hatékonyabb használatát illetően, valamint humán vonatkozásban is fontos tanulságokkal szolgálhat.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A paraquat (Pq, 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridil) a bipiridil típusú herbicidek családjába tartozik. Természetes körülmények között stabil, fehér kristályos anyag, melynek olvadáspontja 300°C-nál van (1. táblázat). Vízben jól oldódik, szerves oldószerekben gyakorlatilag oldhatatlan. Rendkívül stabil vegyület, bomlása során – melyet vizes oldatban az UV sugárzás katalizál – 4-karboxil-1-metil piridinium-klorid keletkezik (Ross és Krieger, 1980, Paraquat Information Center [www.paraquat.com](http://www.paraquat.com)).

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Általános név:</b>              | Paraquat  |
| <b>További nevek:</b>              | Metil-viologén  |
| <b>Kémiai név:</b>                 | 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion   |
| <b>Összegképlet:</b>               | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> <sup>2+</sup>                        |
| <b>Molekulasúly:</b>               | 257 g/mol   |
| <b>Fotostabilitás:</b>             | UV fény hatására, vizes oldatában lebomlik  |
| <b>Vízoldékonyság:</b>             | 620 g/l (20 °C)   |
| <b>Gőznyomás:</b>                  | 10-9 mm Hg  |
| <b>Partíciós<br/>koefficiens:</b>  | 4,4683  |
| <b>Abszorpció<br/>koefficiens:</b> | 1 000 000 (becsült érték)   |
| <b>Töltésselölés:</b>              |    |
| <b>Szerkezeti képlet:</b>          |  |

1. táblázat A paraquat fizikai-kémiai tulajdonságai (Paraquat Information Center, Weed Science Society, 1994 és Wauchope et al, 1992 alapján)

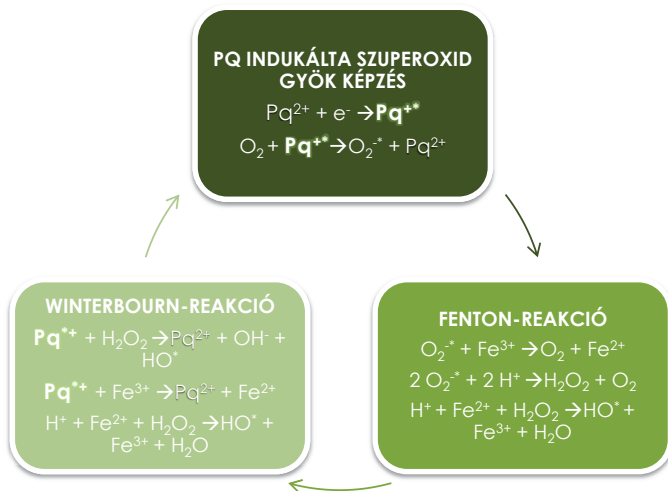


1. ábra A paraquat a PSI redukáló oldalán fejt ki hatását az elektronok eltérése által. (Dodge 1971, Fujii et al, 1991 alapján)

Herbicidként alkalmazva hatásának kifejtéséhez fény és oxigén jelenléte szükséges. Fitotoxikus képessége alacsony redoxpotenciál értékén alapul, melynek következtében a fotoszintézis I. fotokémiai rendszerének (PSI) redukáló oldalán az elektrontranszport lánc FeSx komponensénél bekapcsolódva az elektronokat fiziológias útvijukról eltereli (1. ábra), majd azokat felvéve paraquat kation gyökké alakul (Dodge 1971, Fujii et al, 1991).

Elektronok hiányában nemcsak kevesebb NADPH termelődik, hanem a képződött paraquat kation gyökök reakcióképességük folytán a kloroplasztiszban a molekuláris oxigénnel kölcsönhatva szuperoxid anion gyököket generálnak, míg maguk regenerálódnak, visszaalakulnak paraquat kationná (Bowyer és Camilleri, 1985). A szuperoxid anion gyökök – hasonlóan egyéb stresszhatások során lejátszódó folyamatokhoz – savas közegben protonálódhatnak és hidrogén-peroxidot képezhetnek (Babbs et al, 1989).

A képződött hidrogén-peroxid molekulák további szuperoxid anion gyökök mellett, a Haber-Weiss reakcióban hidroxil gyököket is létrehozhatnak. A folyamatot szabad Fe<sup>3+</sup> és Cu<sup>2+</sup> ionok katalizálják, melyek Fe<sup>2+</sup> és Cu<sup>+</sup> ionokká redukálódva a Fenton-reakció során további reaktív gyököket hoznak létre. A paraquat kation redukált formája közvetlen is reakcióba léphet a Fe<sup>3+</sup> ionnal a Winterbourn-reakcióban (Vile et al, 1987) (2. ábra).



2. ábra A paraquat hatásmechanizmusa

Mint látható, egyetlen paraquat molekula is rendkívüli mértékű szabadgyök-képző hatással bír. A nettó termékként jelentkező aktív oxigénformák ( $OH^{\bullet}$  és  $O_2^{\bullet-}$ ) károsítják a fotoszintetikus pigmenteket (Pölös et al, 1987), peroxidálják a lipideket, dezorganizálják a lipidtartalmú membránokat (Hiyama et al, 1993, Váradi et al, 2000), ezáltal növelik a membránok permeabilitását, csökken a turgornyomás, a növény pedig végül elszárad (Harvey és Fraser, 1980). Hasonlóan egyéb oxidatív stresszhatásokhoz, a reaktív oxigénformákat a szuperoxid-diszmutáz, a kataláz, a Haliwell-Asada út és a xantofill-ciklus próbálja eliminálni a rendszerből.

A paraquat a növény felszínére kerülve gyorsan, fél-másfél órán belül penetrálódik a növénybe. A tünetek a környezeti tényezőktől függően egy napon belül már jelentkezhetnek. Autokatalitikus jellegéből adódóan a paraquat rendkívül hatékony (Babbs et al, 1989). Mivel a paraquat a folyamathoz szükséges elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszportlánctól veszi el, ezért a hatás nagymértékben függ a fényintenzitástól: erős napfényben korlátozott a hatóanyag transzlokációja, ilyenkor gyors a hatáskifejtés, a kontakthatás erősebb. Az alacsonyabb fényintenzitás vagy alacsonyabb hőmérséklet elősegíti a herbicid szétterjedését a növényben (Hunyadi és Almádi, 1981, Halász et al, 2002).

| Faj latin neve                     | Származási hely                | Év   | Rezisztencia faktor |
|------------------------------------|--------------------------------|------|---------------------|
| <i>Amaranthus lividus</i>          | Malajzia                       | 1990 | n.a.                |
| <i>Arctotheca calendula</i>        | Ausztrália (Victoria)          | 1986 | 60                  |
| <i>Bidens pilosa</i>               | Kenya                          | 1991 | n.a.                |
| <i>Ceratopteris richardii</i>      | Egyesült Államok               | n.a. | 10-40               |
| <i>Conyza bonariensis</i>          | Egyiptom                       | 1989 | 150                 |
|                                    | Japán                          | 1989 | n.a.                |
|                                    | Dél-Afrikai Köztársaság        | 2003 | n.a.                |
| <i>Conyza canadensis</i>           | Japán                          | 1980 | 100                 |
|                                    | Magyarország                   | n.a. | 450                 |
|                                    | Kanada (Ontario)               | 1993 | n.a.                |
|                                    | Egyesült Államok (Mississippi) | 1994 | n.a.                |
|                                    | Belgium                        | 1998 | n.a.                |
|                                    | Egyesült Államok (Delaware)    | 2003 | n.a.                |
| <i>Conyza sumatrensis</i>          | Japán                          | 1980 | 400                 |
|                                    | Taiwan                         | 1980 | n.a.                |
|                                    | Malajzia                       | 1990 | n.a.                |
|                                    | Sri Lanka                      | 1998 | n.a.                |
| <i>Crassocephalum crepidioides</i> | Malajzia                       | 1990 | n.a.                |
| <i>Cuphea carthagenensis</i>       | Fiji-szk.                      | 1984 | n.a.                |
| <i>Eleusine indica</i>             | Malajzia                       | 1990 | n.a.                |
|                                    | Egyesült Államok (Florida)     | 1996 | n.a.                |
| <i>Epilobium adenocaulon</i>       | Belgium                        | 1982 | 10                  |
|                                    | Egyesült Királyság             | 1989 | >5                  |
| <i>Erigeron philadelphicus</i>     | Japán                          | 1989 | 250                 |
| <i>Hordeum glaucum</i>             | Ausztrália (Victoria)          | 1984 | 250                 |
|                                    | Ausztrália (Dél-Ausztrália)    | 1990 | n.a.                |
| <i>Hordeum leporinum</i>           | Ausztrália (Victoria)          | 1988 | 100                 |
|                                    | Ausztrália (Dél-Ausztrália)    | 2001 | n.a.                |
| <i>Ischaemum rugosum</i>           | Malajzia                       | 1989 | n.a.                |
| <i>Landoltia punctata</i>          | Egyesült Államok (Florida)     | 2001 | n.a.                |
| <i>Lepidium virginicum</i>         | Kanada (Ontario)               | 1993 | n.a.                |
| <i>Lolium perenne</i>              | Egyesült Királyság             | n.a. | 6-10                |
| <i>Lolium rigidum</i>              | Dél-Afrikai Köztársaság        | 2002 | n.a.                |
|                                    | Ausztrália                     | n.a. | 14                  |
| <i>Mitracarpus hirtus</i>          | Ausztrália (Queensland)        | 2007 | n.a.                |
| <i>Monochoria korsakowii</i>       | Japán                          | 1994 | n.a.                |
| <i>Parthenium hysterophorus</i>    | Kenya                          | n.a. | n.a.                |
| <i>Poa annua</i>                   | Egyesült Királyság             | 1981 | 3-4                 |
|                                    | Belgium                        | n.a. | n.a.                |
| <i>Rehmannia glutinosa</i>         | Kína                           | n.a. | n.a.                |
|                                    | Dél-Korea                      | n.a. | n.a.                |
| <i>Solanum americanum</i>          | Egyesült Államok (Florida)     | 1985 | 12                  |
| <i>Solanum nigrum</i>              | Malajzia                       | 1990 | n.a.                |
| <i>Vulpia bromoides</i>            | Ausztrália (Victoria)          | 1990 | 5-6                 |
| <i>Youngia japonica</i>            | Japán                          | 1980 | 110                 |

2. táblázat Paraquat-rezisztens növényfajok. Rezisztenciafaktor: cPq1c50R/cPq1c50S (Szigeti, 2000 és Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. August 11, 2008. <http://www.weedscience.com> nyomán).



Hasonlóan egyéb, ismétlődően, hosszabb időszakon keresztül alkalmazott herbicidhez a paraquattal szembeni tolerancia és rezisztencia is rövid időn belül kifejlődött számos fajnál. Egyaránt találunk köztük pro- és eukariótát, egysejtűt illetve szövetes élőlényt, növényt, gombát, sőt állatot is (Szigeti 2000, Fujii et al, 2004, Vermeulen et al 2005). A rezisztens növényfajok mind rendszertanilag mind földrajzi elhelyezkedés szerint széles spektrumot ölelnek fel. A fajok között egy- és kétszikűek egyaránt találhatóak, mind az öt földrészen. A területek közül kiemelkedik Ausztrália, az Egyesült Államok és az ázsiai térség – érdekes módon pont azok a területek, ahol a bipiridil-származékokat máig alkalmazzák (2. táblázat).

A 2. táblázatban felsorolt, rezisztens növények között kimagasló, élettani állapotától függően akár 450-es rezisztenciafaktorral is bír a betyárkóró, rendszertani nevén *Conyza canadensis* (L.) Cronq. paraquat rezisztens biotípusa (Vaughn KC, 2003). Az Észak-Amerikából származó, Európában a XVII. század közepén megtelepedett növény – melyet régebbi rendszertani nevén *Erigeron canadensis*-ként is ismerhetünk – az *Asteraceae* családba tartozik (Cronquist A, 1976) (3. táblázat).

| Taxon:               | Besorolás:                           |
|----------------------|--------------------------------------|
| <b>Regnum:</b>       | <i>Plantae</i>                       |
| <b>Subregnum:</b>    | <i>Tracheobionta</i>                 |
| <b>Superdivisio:</b> | <i>Spermatophyta</i>                 |
| <b>Divisio:</b>      | <i>Magnoliophyta</i>                 |
| <b>Classus :</b>     | <i>Magnoliopsida</i>                 |
| <b>Subclassus:</b>   | <i>Asteridae</i>                     |
| <b>Ordo:</b>         | <i>Asterales</i>                     |
| <b>Familia:</b>      | <i>Asteraceae</i>                    |
| <b>Genus:</b>        | <i>Conyza</i> Less.                  |
| <b>Species:</b>      | <i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq. |

3. táblázat A *Conyza canadensis* taxonómiaja (USDA PLANTS adatbázis alapján)

Hazánkban széles körben elterjedt, leginkább a mérsékeltén száraz, tápanyagban gazdag, többnyire csak gyengén humuszos, agyagos vagy vályogos talajokat kedveli, a melegebb fekvésű helyeken, parlagon hagyott szántóföldeken, erdőirtások, utak, vasúti töltések mentén, gyomtársulásokban jelenik meg, olykor tömegesen. Az olykor másfél méteres magasságot is elérő egynyári, adventív gyomnövény orsógyökerű fészkesvirágzatú (3. ábra). Felálló, hengeres szára van, mely felső részén erősen ágas, alsó részén sűrűn

leveles, szőrös vagy érdes. A tőlevelek szálás lándzsásak vagy hosszúkás lándzsásak, a külsők csúcson 3 tompa fogúak. A szárlevelek szálás lándzsásak, hegyesek, ép szélűek vagy fűrészesek, berzedt szőrűek, az alsók nyélbe keskenyedők, a felsők ülők (Horánszky és Járainé, 1990).



3. ábra *A Conyza canadensis virágzata és habitusa* (fotó: Les Binns és John Hardy, flickr.com)

A *Conyza* fajokkal szembeni paraquatkezelés hatékonyságának csökkenését a hetvenes évek második felében figyelték meg, de a paraquat-rezisztenciával, okaival foglalkozó publikációkat csupán a nyolcvanas évek közepén kezdték közzéadni. (Harvey és Harper, 1982). A rezisztens fajok megjelenése óta a paraquattal szembeni ellenálló képesség magyarázatára számos elmélet született, melyet azonban kísérletesen nem, vagy csak részben sikerült igazolni. Az egyik legelső hipotézis szerint a paraquat hatáshelye, a PSI akceptor oldala körüli redoxpotenciál viszonyok megváltozása tehető felelőssé a rezisztenciáért (Cheung et al, 1988). Elektron spin rezonancia spektroszkópia vizsgálatokkal igazolták, hogy a FeSx vas-kén protein a *Conyza pennsylvanica* és más fajok paraquat rezisztens biotípusában változatlan formában található meg (Norman et al, 1993). Az aktív hely hasonló módon változatlanak bizonyult *Lolium perenne*-ben

(Harvey et al, 1980), *Hordeum glaucum*-ban (Powles és Cornic, 1987) valamint a *Conyza canadensis*-szel közeli rokon *Conyza bonariensis*-ben (Fuerst et al, 1985). A szentivív rezisztens *Conyza* biotípus között sincs a hatóhely tekintetében különbség: a paraquat az elektronokat a fiziológiás útvjáról mindkét esetben eltéríti (Lehoczki 1993, Norman et al, 1993).

Nem találtak bizonyítékot arra sem, hogy a *Conyza* képes metabolizálni a paraquatot. Metabolizálódást csak talajlakó baktériumokban (*Bacillus subtilis*) és egyes gombafajokban (*Lipomyces starkeyi*) igazoltak (Funderburk és Bozarth, 1967, Carr et al, 1985). Magasabb rendű növények között egyedül a *Rehmannia glutinosa*-ban sikerült kimutatni indirekt módon a paraquat metabolizmusát, ami vélhetően egy fenilpropanoid glikozid származéknak köszönhető, mely a paraquatot kémiai kötés vagy módosítás során inaktiválja (Chun et al 1997, Chun et al 2002).

Mivel a paraquat hatásmechanizmusa a szuperoxid-aniongyök képzésén és az általa okozott oxidatív stresszen alapszik, egy jól működő antioxidáns védőenzimrendszer bizonyos mértékű paraquat toleranciát eredményezhet. A sorbakapcsolt enzimeket magába foglaló rendszer fiziológiás körülmények között a kloroplasztisban keletkező aktív oxigénformák eliminálásában játszik szerepet. Az enzimrendszer tagjai között a szuperoxid-diszmutáz (SOD) a szuperoxid anion gyökből hidrogén-peroxidot és oxigénmolekulát képez. A szintén reaktív hidrogén-peroxidot az aszkorbát-glutation ciklus eliminálja a kloroplasztisban. Oxidatív stressz esetén a ciklusban résztvevő aszkorbát-peroxidáz, a dehidroaszkorbát-reduktáz és a glutation-reduktáz enzimek aktivitása megnő. Megfigyelték, hogy a paraquattal és szalicilláttal – mely a szisztémikusan szerzett rezisztenciát indukálja – egyszerre kezelt dohánylevelek esetén a paraquat hatása sokkal kisebb mértékű. (Silverman et al 2005)

Fokozottabb paraquat toleranciát tapasztalhatunk a hosszabb életidejű fajok illetve fajon belüli biotípusok esetén. Az *Arabidopsis thaliana* gigantea (gi-3) mutánsa, mely egyike a legkésőbbi virágzású, leghosszabb életidejű mutáns vonalnak, egyaránt toleránsnak bizonyult csekély mennyiségű paraquat- és hidrogén-peroxidos kezelésre. (Kurepa et al 1998) Az ilyen hosszú életidejű növény- illetve állatfajok általános jellemzője a rendkívül jól működő oxidatív stressztolerancia mechanizmus (Vermeulen et al, 2005). Ezzel együtt a ciklus enzimeinek fokozott aktivitását mutató növényfajok legfeljebb 10-es

értékű rezisztencia faktorról bírnak (Schaaltiel és Gressel, 1986, Norman et al 1993); ezt inkább paraquat toleranciának, mintsem igazi rezisztenciának lehet mondani.

Nagyfokú rezisztencia nem magyarázható a megnövekedett aktivitású védőenzimrendszer működésének eredményeként. Problémát jelent az energetikai rendszer kimerülése; a paraquat gyök autokatalitikus folyamatok során, molekuláris oxigénnel reagálva könnyen visszaalakul paraquat kationná, hogy újabb szuperoxid gyököket generáljon. Mivel a kloroplasztiszban a NADPH készlet limitált, éppen a paraquat elektroneltérítő hatása miatt feltételezhető, hogy a szuperoxid generátor paraquat kation valamilyen módon inaktív állapotba kell, hogy kerüljön.

A védőenzim-elméletet cáfolják azon kísérleteink is, melyek során bizonyítottuk, hogy a paraquat rezisztens *Conyza* biotípus a szenzitívhez hasonló módon reagál egyéb, szuperoxid generáló ágensekre. Menadion hatására mind a szenzitív, mind a rezisztens biotípus egyedei elpusztultak: egyező mértékben aktív antioxidáns enzimrendszerük nem képes kivédeni a paraquattól molekuláris szerkezetében különböző, de hatásában szintén szuperoxid-gyök generátor menadion által okozott stresszt (Jóri et al, 2007).

Az oxidatív stresszhez kapcsolódóan átmeneti megoldást jelent a reaktív gyököket ( $O_2^*$ ,  $OH^*$ ) generáló egyéb folyamatok lassítása. Ha a paraquat által generált szuperoxid gyök csökkent mennyiségben fér hozzá szabad  $Fe^{3+}$  ionokhoz, kevesebb redukált állapotú  $Fe^{2+}$  keletkezik a Fenton-reakció során, mely kevesebb  $OH^*$  gyököt képez a  $H_2O_2$ -ből. A leginkább a lipidmembránokat roncsoló reaktív hidroxil gyök termelődése szempontjából fontos tehát a szabad  $Fe^{3+}$  szint intracelluláris szabályozottsága, szuperoxid-gyök képződése során a vasionok eliminálása. (Halliwell, 1993). Ferritin génnel transzformált, ferritint túlexpresszálo dohánynövények paraquat-toleranciát mutattak (Deák et al, 1999)

Egy másik, szintén korai hipotézis szerint a rezisztenciát a paraquat akadályozott felvétele okozza. Az elképzelés szerint a paraquat már a sejtfalban kötődik, a lignifikálódott részeken adszorbeálódik, illetve az epikutikuláris viaszrétegen keresztül nehezen penetrálódik (Vaughn et al, 1989). A publikált eredmények mindezt cáfolták. A *Conyza canadensis*-szel azonos genusba tartozó *Conyza bonariensis* fajban bizonyították, hogy az ellenálló képességet nem okozhatja a herbicid csökkent mértékű kutikuláris penetrációja (Fuerst et al, 1985). A kísérletekben a  $C_{14}$ -gyel jelölt paraquat bejutott a sejtbe és hatáshelyére, a kloroplasztiszba. Az elektronakceptoroként szolgáló paraquat kezelés

hatására az izolált kloroplasztiszokban az elektrontranszport serkentése hasonló mértékű volt.

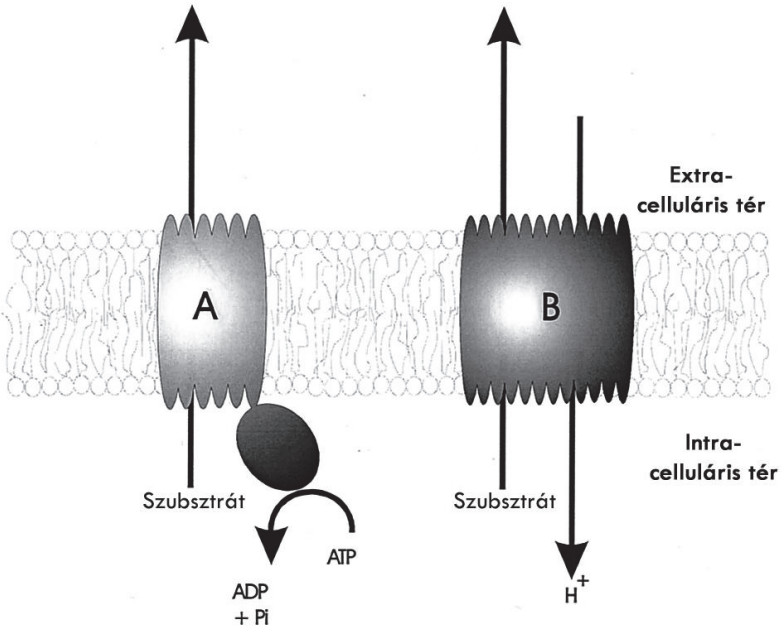
A korlátozott felvétel elméletét cáfolják az általunk *Conyza*-n végzett sejtfractions kísérletek is (Jóri et al, 2007). Azt is leírták, hogy a paraquat mind a szenzitív, mind a rezisztens *Conyza* biotípusban bejut a sejtbe (Lehoczki 1988). A paraquat tehát nem kötődik meg a sejt falban, hanem azon és a plazmalemmán keresztül bejut a sejtbe, - sőt, a rezisztens biotípusban egy hónap után is kimutatható a citoszólát és a vakuólumokat tartalmazó frakcióban (Jóri et al, 2007).

Mivel a paraquat metabolizálódását nem mutatták ki eddig *Conyza*-ban, hatáshelye sem módosult, valamint egyetlen működő védőenzimrendszer sem volt képes önmagában magas fokú rezisztenciát okozni, ezért a rezisztenciáért más mechanizmus felelős. Valószínűsíthető, hogy a sejtekbe jutott paraquat a hatáshelyéről eltávolítódik és inaktív kompartmentben különítődik el. *Conyza bonariensis* esetén autoradiográfias követési módszerrel vizsgálták a <sup>14</sup>C-gyel jelölt paraquat leveleken belüli lokalizálódását (Fuerst et al, 1985). Megfigyelték, hogy míg a szenzitív egyed levelein belül a paraquat elhelyezkedése egyenletes, addig a rezisztens típusban elsősorban a vaszkularizált szövetekben, a levélnyel alsóbb régióiban volt megtalálható, azaz az apoplaszton keresztüli haladása gátolódott, és amint a vaszkularizált szövetekből átjutott a fotoszintetikus mezofillum sejtjeibe, a paraquat vakuolumba kompartmentalizálódott.

*Conyza canadensis* esetén a fotoszintetikus apparátus működését vizsgálták szenzitív és rezisztens biotípusokban. A rezisztens növényekben a PSII optimális kvantumhatékonyságát tükröző, így a növények funkcionális aktivitását jellemző változó és maximális fluoreszcencia (Fv/Fm) hányados értéke a kezelést követően a szenzitívhez hasonló módon csökkent. Azonban a rezisztens biotípusban az átmeneti gátlást követően helyreállást figyeltek meg. A paraquat tehát eljutott a hatás helyéig, de az átmeneti gátlás után a funkció helyreáll (Lehoczki és Szigeti, 1988, Lehoczki et al, 1992). Hasonlót figyeltek meg *Hordeum glaucum* esetében. A penetráció kinetikája megegyezett a szenzitív és rezisztens biotípusokban, de a bejutást követően a rezisztens biotípusban a paraquat vakuólumokba szállítva került inaktív állapotba (Lasat et al 1997).

A paraquat transzportjában központi kérdés a membránokon történő átjutás, mivel a kétértékű, pozitív nettó töltésű molekula nem képes átdiffundálni a hidrofób foszfolipid rétegeken, mely transzporter segítségével valósulhat meg.

Toxikus ágensek eliminációjáért felelős egyetlen gén által kódolt multidrog-rezisztenciát (MDR) okozó rendszert az élővilág bármely csoportjában találunk. A multidrog-rezisztenciáért felelős transzport-fehérjéket két nagy osztályba sorolhatjuk: az ABC-transzporterek és a másodlagos multidrog-transzporterek (4. ábra) (Putman et al, 2000).

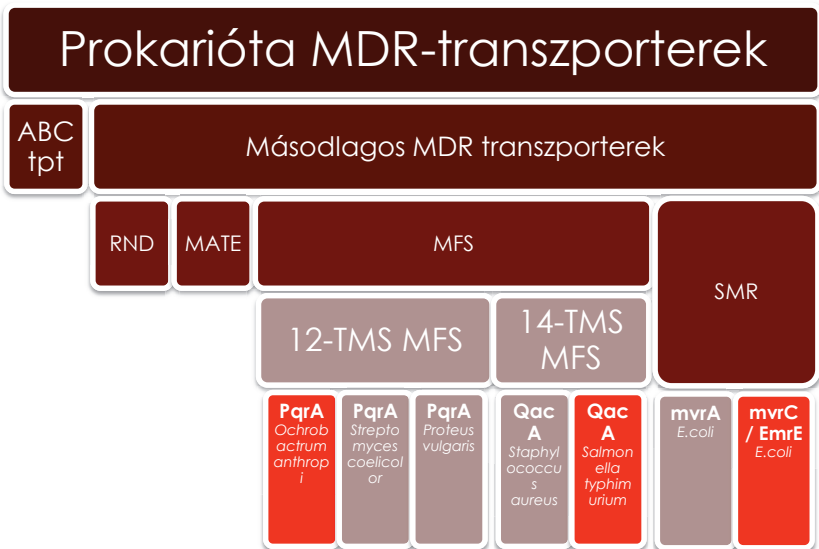


4. ábra Multidrog transzporterek két fő osztálya. (A) ABC-típusú MDR fehérje, mely a szubsztrát kijuttatásához szükséges energiát az ATP hidrolíziséből nyeri. (B) Másodlagos multidrog-transzporter a strukturálisan különböző drogokat H<sup>+</sup> vagy Na<sup>+</sup> ion ellenében juttatja az extracelluláris térbe. (Putman et al, 2000 alapján)

Az ABC-transzporterek a legismertebb multidrog-rezisztenciát okozó rendszerek, melyek ATP-kötő kazetta doménnel rendelkeznek, és többek között tumoros megbetegedések kemoterápiás válaszában okoznak multidrog-rezisztenciát (Doige és Ames, 1993, Gros et al 1986). Gyakorlatilag minden pro- és eukarióta szervezetben, többféle anyag transzportjában vesznek részt. Szállíthatnak ionokat, szénhidrátokat, lipideket, xenobiotikumokat, antibiotikumokat, pigmenteket, de még akár hosszabb polipeptideket is (Gottesmann és Pastan, 1993). Korábbi vizsgálataink során kiderült: a

*Conyza* rezisztenciájáért vélhetőleg nem ABC jellegű, multidrog-rezisztencia fehérje felel. A paraquattal együtt alkalmazott, az ABC-transzportereket speciálisan gátló vanadát-illetve verapamil-kezelés nem befolyásolta jelentősen a helyreállási folyamatot a rezisztens biotípus esetén. (Halász et al 2002).

A másodlagos multidrog transzporterek az ABC-transzporterek mellett külön osztályt képeznek a multidrog-rezisztenciát okozó fehérjék közt. Ezek leginkább a prokarióták körében kutattak, de eukariótákban is ismeretek homológiák. Jellemző rájuk, hogy a protongradiens (proton motive force, PMF) használva képesek a toxikus anyagokat transzportálni (Putman et al, 2000). Méretük és hasonlóságok alapján felállított beosztást a másodlagos multidrog transzport-fehérjék esetében az 5. ábra mutatja be.



5. ábra Az MDR transzporterek rendszere prokariótákban. RND, (resistance-nodulation-cell division), rezisztencia- noduláció- sejtosztódás- fehérjék családja. MATE, (multidrug and toxic compound extrusion), multidrog - és toxikus ágenseket kilövő fehérjék családja. MFS, (major facilitator superfamily) a legfőbb facilitátor fehérjék családja. SMR, (small multidrug resistance), kisméretű multidrog-rezisztencia fehérjék családja. ABC: ATP-binding cassette transzporter, MDR: multidrog-rezisztencia, TMS: transzmembrán szegmens. A paraquat transzportjára képes, prokariótákból izolált fehérjék narancssárga színnel kiemelve (Putman et al, 2000 alapján)

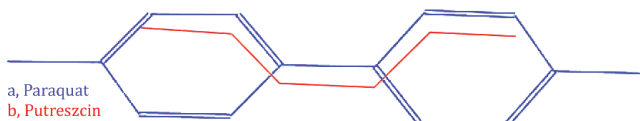
Paraquat transzportjára kizárólag az MFS és SMR családba tartozó fehérjék között írtak le példákat. Az MFS család tagjai megtalálhatók pro- és eukariótákban egyaránt, di- és oligoszacharidok, Krebs-ciklus intermedierek, foszfát-észterek és antibiotikumok szimanti- vagy uniportjéért felelnek, 12 vagy 14 transzmembrán régióval (TMS) rendelkeznek. Az MFS fehérjecsalád 14-TMS klaszterjába tartozik a *Staphylococcus aureus* mono- és divalens kationok transzportjéért felelős QacA gén terméke. Ezzel mutat nagyfokú hasonlóságot a *Salmonella typhimurium* faj plazmidon elhelyezkedő rezisztenciagénje, mely paraquattal szemben okoz rezisztenciát (Hongo et al 1994).

Az MFS fehérjecsalád 12-TMS klaszterjába sorolják az *Ochrobactrum anthropi* paraquat rezisztens JW2 vonalából izolált rezisztenciagénjét, a PqrA-t. A 410 aminosavból álló, 42 kilodaltonos polipeptid 12 transzmembrán szegmensre tagolódik, membránintegráns fehérjét alkot. A gént *Escherichia coli*-ba transzformálva a gazdasejtek ellenállóvá váltak paraquattal szemben. (Won et al, 2001). A pqrA gént ezen kívül nemcsak *E. coli*-ban, hanem dohány növényben is sikerült expresszálni. A transzgénikus dohánynövény, melyben a pqrA gén meglétét és expresszióját immunoblot analízissel is igazolták, paraquatra nézve rezisztenssé vált, viszont egyéb aktív oxigénforma generáló ágensekre – mint a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy a menadion – továbbra is érzékeny maradt (Jo et al, 2004).

Az SMR családba tartozik az egyik leghatékonyabb prokarióta paraquat-transzport rendszer. Az *E. coli* K12-es mutáns törzsében a metil-viologén bejutását gátló, rezisztens törzsekre jellemző 12 kilodalton tömegű, membránintegráns protein mvrC – újabb nevén EmrE – mellett találjuk a szuperoxid-gyök redukáló képességet okozó mvrA gént (Morimyo, 1988, Morimyo et al, 1992). Az EmrE, melyet régebben mini-TEXAN-ok közé, ma már az SMR családba csoportosítanak, kisméretű, 110 aminosavból álló fehérje. A fehérje szubsztrátkötésében kulcsfontosságú szerepet játszik a Glu-14 aminosav, mely tulajdonság a többi SMR fehérjére is jellemző. A génjét tartalmazó plazmid kópiaszámának emelésével fokozódó paraquat-rezisztenciát figyeltek meg. Az EmrE monomerjei – melyek önmagukban csak monovalens ionokat transzportálnak – fiziológiai körülmények közt dimerekké állnak össze, így képesek divalens vegyületet mozgatni (Schuldiner 2007a,b). Az antiporter méretében és töltéseloszlásában is igen hasonló a H<sup>+</sup>-ATPáz kisméretű membránkötött „c” alegységéhez (Yerushalmi et al, 1995, Rotem és Schuldiner, 2004).



A paraquatot nem csak MDR fehérjék képesek a sejtet illetve partikulumait határoló membránokon átjuttatni. Az MDR-rendszerek mellett egyéb, membránintegráns transzporterek is alkalmasak toxikus ágensek transzportjára. Ezek olyan, tág szubsztrátspecifitású transzporterek, melyek alapvető funkciója a mesterségesen szintetizált molekulához – esetünkben a paraquathoz – hasonló szerkezetű, töltéseloszlású természetes molekulák membránokon keresztül történő juttatása (Rotem and Schuldiner, 2004).



6. ábra Az egymáshoz töltéseloszlásában hasonló paraquat (a, kék) és a putreszcin (b, piros) molekulamodelljezése (Erős D, 2006 személyes közlés)

A bipiridil paraquathoz bivalens karakterében és töltéseloszlásában hasonló molekulák a poliaminok, elsősorban a putreszcin (6. ábra). A szabad állapotukban pozitív töltésű poliaminok a növényi sejtek szinte minden részében megtalálhatóak, így a citoszólban, mitokondriumban, kloroplasztisban, vakuólumban vagy akár a sejtfalhoz kötve. A sejtek külső poliamin-felvételére alkalmas transzporterekkel rendelkeznek, poliamin-tartalmukat a bioszintézisen és lebontáson kívül a különböző poliamintranszport folyamatok is szabályozzák (Igarashi és Kashiwagi 1999).

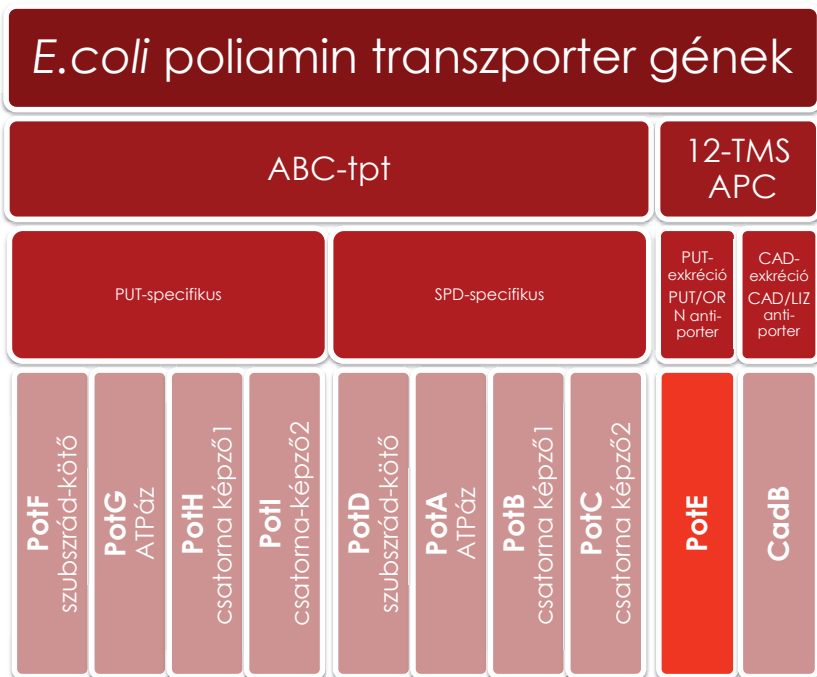
A poliaminok kapcsolata a paraquat-rezisztenciával régóta ismert. Az állatvilágban, az emlősök közt a paraquat epitheliális sejtekbe jutása részben poliamin-felvételi rendszereken keresztül történik meg (Smith, 1982). Humán rendszerben kimutatták, hogy a poliaminok – leginkább a putreszcin – kompetícióban állnak a paraquattal a felvételi mechanizmus során. (Chen et al, 1992, Toursarkissian et al, 1994). Állati szervezetekben is többszörösen bizonyított, hogy a paraquat felvétele a poliamint transzportáló rendszereken keresztül is történhet (Rose et al 1976, Gaudreault et al, 1984, Wyatt et al 1988, Seiler és Dezeure 1990), sőt putreszcinnel kompetitíven gátolható (Brooke-Taylor et al, 1983).

Ehhez hasonló rendszer a növényvilágban sem ismeretlen, Hart és munkatársai eredményei alapján világossá vált, hogy a paraquat felvétele és a poliaminok transzportja között összefüggés áll fenn (Hart et al, 1992.) Munkatársaival kukorica gyökérsejtekben vizsgálták a paraquat és a poliaminok (putreszcin, kadaverin, spermin) felvételét. A paraquat és a putreszcin influx koncentrációfüggő kinetikája hasonlóan bizonyult: egy, a sejtfal- és membránkötődésből adódó lineáris és egy, a plazmalemmán keresztül irányuló influxot jellemző telítési komponensre volt bontható. A telítési komponens tovább vizsgálva, a kinetikai analízis során különböző paraquat – és poliamin – koncentrációval bíró kísérleti összeállításokban azt tapasztalták, hogy a diamin putreszcin kompetitív módon gátolta a paraquatfelvétel telítési komponensét. Hasonló hatást tapasztaltak az ugyancsak diamin kadaverin esetén is, melynek felvétele mind paraquattal, mind putreszccinnel kompetitív módon gátolhatóan bizonyult. Ezzel ellentétben, a nagyobb méretű, tetravalens poliamin, a spermin nem-kompetitíven gátolta a putreszcin és paraquat influxot. A paraquat és putreszcin influx telítési jellegéből arra következtettek, hogy a folyamat fehérje-közvetített. Tehát a paraquat valamely, alapvetően a putreszcin transzportjára alkalmas karrier-rendszeren át jut be a kukoricagyökér sejtjeibe (Hart et al, 1992.).

További kísérleteik során a paraquat intracelluláris transzportját illetve effluxát vizsgálva etiolált csíranövényekben kinetikai kísérleteikkel bizonyították, hogy a paraquat lassan a citoplazmából a vakuólumba szekvesztrálódik, illetve részben a gyökerek felől a hajtások irányába transzlokálódik (diTomaso et al, 1993). Hart és munkacsoportja már ekkor felvetette, hogy a *Conyza bonariensis* és a *Hordeum glaucum* megnövekedett rezisztenciájáért is hasonló, vakuoláris kompartmentációs mechanizmus felel (Hart et al, 1992, diTomaso et al, 1993). A paraquat nem közvetlenül energizált transzporterekkel jut be a sejtbe, ezt az ép növényi mintákban mérhető negatív transzmembrán potenciál teszi lehetővé. Így a rezisztenciát végső soron okozhatja a paraquat hatékony kiválasztásának, csökkent felvételének vagy szekvesztrációjának eredője (Preston et al, 1992), mely – a szubsztrátok hasonló töltéseloszlása okán – akár a poliamin transzporterek megváltozott aktivitása miatt is lehetséges.

Ezért fontosnak tartottuk azon poliamin transzporterek szerepét tisztázni, melyek más vegyületek transzportjára is alkalmasak. A prokarióta *E. coli*-ban a poliamin anyagcserét vizsgálva kiderült, hogy a különböző típusú poliaminok hasonló transzportrendszereken át veszi fel, így többféle poliamin felvételére alkalmas rendszerek

léteznek. *E.coli*-ban eddig négy poliamin felvételi rendszert azonosítottak: a neutrális pH-n működő, ABC transzporter spermidint preferáló és putreszcin-specifikus felvételi rendszerek mellett a savas pH-n aktív PotE a putreszcin exkrécióban és putreszcin-ornitin antiporter folyamatban, míg a hasonlóan alacsony pH-jú környezetben működő CadB a kadaverin kiválasztásban és kadaverin-lizin antiportban vesz részt (Igarashi és Kashiwagi, 1999, Uemura et al, 2007) (7. ábra).

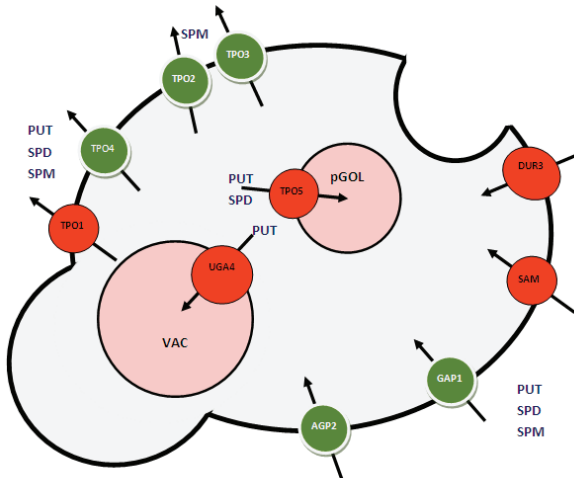


7. ábra: Poliamin transzport rendszereket kódoló gének hierarchiája *E.coli*-ban. ABC: ATP binding cassette protein transzporter, TMS: transzmembrán szegmens, APC: aminosav-poliamin-organokation transzporter, LIZ: lizin, ORN: ornitin, PUT: putreszcin, SPD: spermidin, CAD: kadaverin. Igarashi és Kashiwagi, 1999 alapján.

A PotE 46 kDa tömegű membránintegráns fehérje, melynek N és C terminálisa is a citoplazma felé mutat. A PotE magas fokú specifitást mutat putreszcinre nézve. Szerepe a putreszcin felvételében és a sejtből történő kijuttatásában van, utóbbira putreszcin-ornitin antiporter aktivitás teszi képessé (Kashiwagi et al, 1997, Tomitori et al, 2001). Az aktív centumként megjelölt Glu<sup>77</sup>, Glu<sup>207</sup> és Glu<sup>433</sup> aminosavak a transzportaktivitás miatt

fontosak: a fenti pozíciókban sérült mutáns törzseknel a putreszcín felvétele és az exkréciója is csökkent. Mind a három pozíció a hidrofíli régiókban található, a citoplazma felőli oldalon, ezért elképzelhető, hogy a putreszcín kötőhely kialakításában vesznek részt.

Az *E.coli* PotE-hez hasonló funkciót betöltő fehérjét találtak *Haemophilus influenzae*-ben is, ahol a transzportaktivitás szempontjából fontos glutaminsavak az *E.coli*-hoz hasonlóan, a 77-es, 207-es és 433-as pozícióval ekvivalens pozícióban található meg. Többféle poliamin felvételére alkalmas rendszert és PotE homológot nemcsak pro- hanem eukarióták között is találunk. A *Leishmania* nevű protozoából izolált, APC aminosav-poliamin-organokation transzporter szupercsaládba tartozó, sejt felszínén lokalizált, vélhetőleg proton szimporter LmPOT1 viszonylag nagy affinitással bír putreszcínre és spermidinre, egyéb aminosavak transzportjára azonban nem képes (Hasne és Ulmann, 2005). A poliamin transzportrendszereket és működésüket leginkább az élesztőben tárták fel. Ezen poliamintranszporterek alacsony szubsztrátspecifitásukból eredően putreszcín és spermidin transzport mellett aminosavak felvételére is képesek.



8. ábra Poliamintranszporter rendszerek az élesztőben (Uemura et al, 2007 alapján). VAC: vakuólum, pGOL: Post-Golgi partikulum, PUT: putreszcín, SPD: spermidin, SPM: spermin

Az élesztőben négy, membránlokalizált, poliamin exkrécióért felelős fehérjét (TPO1-TPO4) azonosítottak, ezen kívül a vakuólumon elhelyezkedő UGA4-et, mint gamma-aminovajsav transzportert. A plazmamembránon lokalizált GAP1 változatos

szubsztrátspecifitást mutat: a putreszcín és spermidin mellett aminosavak felvételére képes. (Uemura et al, 2007) Az AGP2, mely a plazmalemmában és a tonoplastban is megtalálható a spermidin felvétel mellett aminosav-permeázként is működik. (Aouida et al, 2005). Az aminosav-poliamin organokation transzporterek közé tartozó SAM3 alapvető szubsztrátjai az S-adenozil-metionin, a glutaminsav és a lizin, de poliaminokat is szállít; a putreszcín és spermidin felvétel nagy része is ezen a transzporterén át zajlik. Az elsődlegesen ureatranszporterként leírt, PTK2 által szabályozott DUR3 is széles spektrummal rendelkező rendszer, mely poliaminokat is képes a citoplazmába juttatni az extracelluláris térből (8. ábra, 4. táblázat) (Uemura et al, 2007).

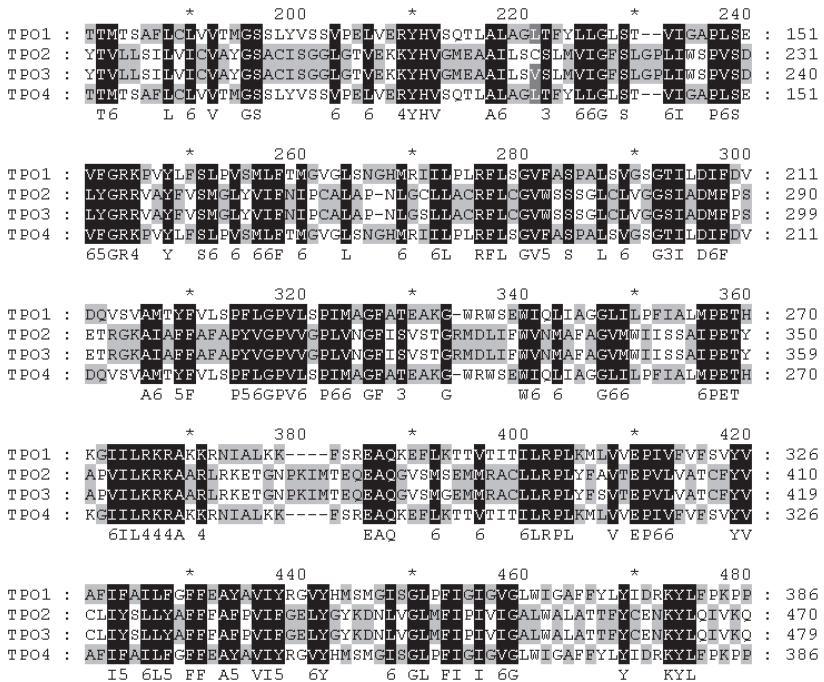
| Szubsztrát   | Lokalizáltság           | Típus  |
|--|-------------------------|--|
| <b>TPO1</b> PUT, SPD, SPM                                  | plazmamembrán. vakuólum | 12-TMS H+/drog antiporter  |
| <b>TPO2</b> SPM  | plazmamembrán. vakuólum | 12-TMS H+/drog antiporter  |
| <b>TPO3</b> SPM  | plazmamembrán. vakuólum | 12-TMS H+/drog antiporter  |
| <b>TPO4</b> PUT, SPD, SPM                                  | plazmamembrán. vakuólum | 12-TMS H+/drog antiporter  |
| <b>TPO5</b> PUT, SPD                                       | Golgi, poszt-Golgi      | APC1, L-típusú   |
| <b>UGA4</b> PUT, GABA                                      | vakuólum                | APC1   |
| <b>GAP1</b> PUT, SPD, aminosavak                           | plazmamembrán           | -típusú APC  |
| <b>AGP2</b> SPD, SPD szubsztituensek, carnitin, aminosavak | plazmamembrán, vakuólum | YAT-típusú APC   |
| <b>DUR3</b> urea, SPD, SPM, PUT                            | plazmamembrán           | 16-TMS putreszcín és urea transzporter                               |
| <b>SAM3</b> PUT, SPD, Glu, Lys, SAM                        | plazmamembrán           | S-adenozilmetionin transzporter putreszcín és spermidin transzporter |

4. táblázat Poliamin transzporter rendszerek az élesztőben (Igarashi és Kashiwagi 1999, Tomitori et al, 2001, Uemura et al, 2005, 2007, Tachihaera et al 2005, Aouida et al, 2005 alapján)

Az élesztőknél a poliaminok transzporzáért felelős fehérjék döntő hányadát a TPO (transporter for polyamine) családba tartozó gének kódolják. A TPO-fehérjék elsősorban az élesztő sejtmembránján helyezkednek el, de bizonyos körülmények között a vakuoláris membránokban is megjelennek.

Az egymással homológ TPO gének (TPO2, TPO3, TPO4) különböző poliamin molekulákra specifikusak. Míg a TPO1 és TPO4 putreszcint, spermidint és spermint egyaránt képes volt felismerni, a TPO2 és TPO3 a sperminre szelektív (Uemura et al, 2005). Ez tükröződik szerkezetükben is: a TPO4 inkább a TPO1-gyel, a TPO3 inkább a TPO2-vel mutat hasonlóságot (9. ábra). Ezen gének túlexpresszáása esetén csökkent

poliamintoxicitást figyeltek meg, valamint kimutatták a poliaminok vakuólumban történő akkumulációját.



9. ábra A *Saccharomyces* poliamin-transzporter peptid primer szerkezeteinek CLUSTALW (Thompson et al, 1997) analízise. Forrásszekvenciák: TPO1, TPO2, TPO3, TPO4. Méret és az aminosav töltése alapján a fekete részek teljes, a szürke részek részleges aminosav egyezést jelölnek. A gének alatti sorban a konszenzus szekvenciát tünteti fel a program. Uemura et al, 2005 alapján

A TPO1 génje a XII. kromoszómán helyezkedik el, nagy mértékben hasonlít a prokarióta PotE-hez. (Igarashi és Kashiwagi, 1999). A szubsztrátkötésért felelősnek jelzett három glutaminsav (Glu<sup>207</sup>, Glu<sup>324</sup>, Glu<sup>574</sup>) hasonló helyzetben található, mint az *E.coli* PotE fehérjében (Kashiwagi et al, 1997). A gén által kódolt fehérje 586 aminosav hosszú, 12 putatív transzmembrán szegmessel rendelkezik (Goffeau et al, 1996), így a már említett, *Ochrobactrum anthropi* PqrA paraquatrezisztencia génjét is magába foglaló MFS multidrog-transzporterek családjához hasonlít (Goffeau et al, 1997). Természetes

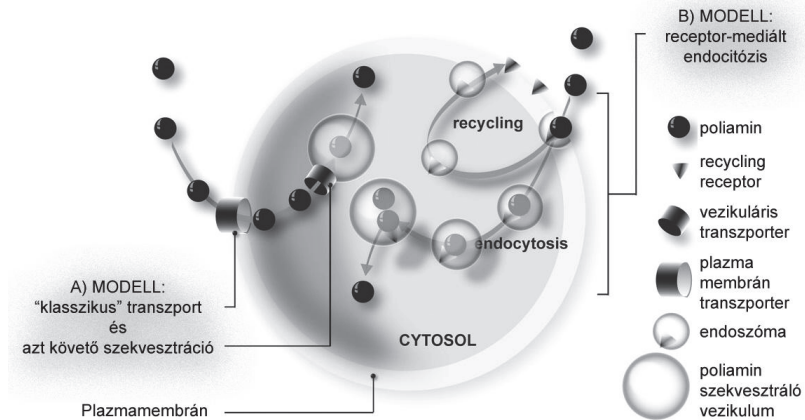
állapotában a plazmamembránban helyezkedik el, és a poliaminok exkréciójában játszik szerepet, alapvetően alacsony aktivitással. Túlexpresszállása esetén viszont a TPO1 fehérje megjelent a vakuoláris membránokban is. Lúgos kémhatású környezetben a TPO1 a poliaminok felvételét, savas környezetben pedig kiválasztását katalizálja (Uemura et al, 2005). A poliamin transzportot a vakuoláris membránon a PTK1, a plazmamembránon pedig a PTK2 protein kinázok szabályozzák (Kakinuma et al, 1995, Nozaki et al 1996, Kaouass et al 1997), melyek valószínűleg a transzporter citoszól felé néző hosszabb, mintegy 180 aminosavnyi, szerinben és treoninban gazdag régiójaihoz képesek kapcsolódni. Ezen kívül rendelkezik még egy (Arg-Arg-Xaa-Thr) szekvenciával, melyet a kalcineurin, egy  $Ca^{2+}$ /kaldmodulin-függő protein-foszfataz ismer fel (Hashimoto és Soderling, 1989).

Rendkívül lényeges hangsúlyozni a TPO poliamin-transzporterek kapcsán a TPO génnek expressziója és a paraquatolerancia közötti korrelációt. Kísérletesen bizonyították, hogy a TPO1 poliamin-transzporter szubsztrátjaként ismeri fel a paraquatot (Tomitori et al, 1999, Uemura et al, 2005). A gént élesztősejtekben fokozott mértékben expresszállva, az a kísérletben poliamin analóggként használt paraquattal szemben toleránsabbak, míg a TPO1 génre nézve knock-out változatokban paraquatra érzékenyebbé váltak, így feltételezhető, hogy az élesztőben a PotE homológ TPO1 poliamin transzporter fehérles felelős a paraquat transzlokációjáért is (Tomitori et al, 1999, 2001).

Protozoák és egysejtű eukarióták mellett az emlősállatok poliamin transzportereinek részletes működési mechanizmusát is sikerült az utóbbi időben tisztázni nem-invazív, fluoreszcens próbákkal jelölt poliamin-analógok alkalmazásával (Soulet et al, 2004). Az eddigi elméletek a receptor-közvetített endocitózist emelték ki, mint legfőbb poliamin-felvételi rendszert. Ezzel szemben poliamin-analógokkal kimutatták, hogy sokkal jelentősebb, sőt egyes esetekben kizárólagos a transzporterek és intracelluláris vezikulumok közreműködésével végbemenő kétlépcsős transzport-út (10. ábra).

A kísérletek azonban nemcsak a poliaminok transzportmechanizmusáról szolgáltattak kulcsfontosságú információt. Ismeretes, hogy a paraquat epiteliális sejtekbe jutása részben poliamin-felvételi rendszereken keresztül történik meg (Smith, 1982). Így ezen, korábbi paraquat-poliamin kompetícióról szóló beszámolók mellett ismét beigazolódott, hogy a poliamin-transzporterek szubsztrát preferenciája – rendszertani

kategóriáktól függetlenül is – nem korlátozódik a poliaminokra, hanem a hasonló töltéseloszlású és méretű molekulákra is kiterjed.



10. ábra Poliamin transzport emlős sejtekben (Soulet et al alapján). A, A kétlépcsős transzport út során a poliamin a sejt membránjában lokalizált transzporterekén keresztül jut a citoszólba. A citoszólból már létező, acidotrófan festődő intracelluláris vezikulumokba szekvesztrálódik egy második, vezikuláris transzporter közreműködésével. B, receptor-mediált endocitózis során a poliamin először a plazmamembránban lokalizált receptorhoz kötődik, majd miután a receptor-poliamin komplex endoszómához kapcsolódik, egy lépéses endocitózis során jön létre a poliamin-szekvesztrációs vezikulum, a PVS.

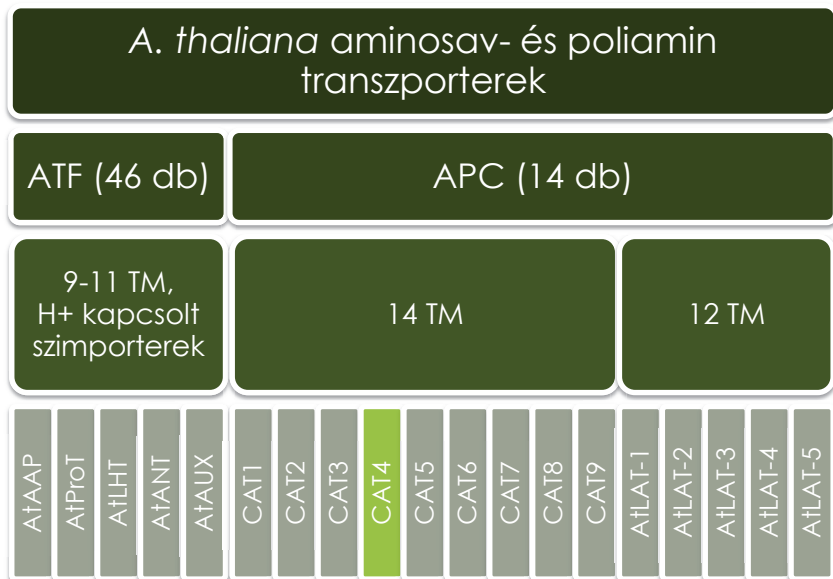
A növényi poliamintranszport kevésbé tanulmányozott, de magasabb rendű növényeknél megfigyelték, hogy a felvételi szint nagyon gyors, a telítést egy-két percen belül eléri, és kétfázisú rendszer jegyeit mutatja a putreszcin két telítődő komponensére nézve (Bagni és Torrigiani, 1992). A vakuólumokban a tonoplaszton keresztül közvetett, míg a mitokondriumokban membránpotenciáltól függő, a mátrix felé irányuló aktív transzport mechanizmusokat mutattak ki (Pistocchi et al, 1990).

Egyes rendszerekben különálló transzporterekkel történik meg a membránon való átjutás (Persson et al, 1996, Seiler et al, 1996) de valószínűsíthető, hogy – mint ahogyan ez az élesztő esetén bizonyított – az aminosavak és a poliaminok képesek megosztotni ugyanazokon a felvételi rendszereken, így többféle poliamin felvételére alkalmas rendszerek (multiple poliamin transporter) is léteznek (Tiburcio et al, 1997). Korán felismert ténynek számít, hogy az aminosavakat transzportáló rendszerek sem



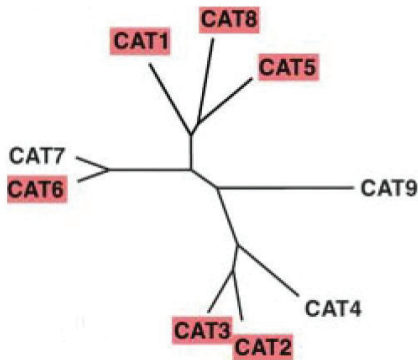
rendelkeznek magas specificitással az egyes aminosavakra nézve, hanem az aminosavak savas vagy bázikus karaktere szerint válogatnak, sőt poliaminokat is képesek transzportálni. (Kinraide, 1981; Wyse és Komor, 1984; Bush, 1993).

Az *Arabidopsis* genomanalízise során kiderült, hogy majdnem 60 olyan gén létezik, melyek vélhetőleg szerepet játszanak az aminosav és poliamin transzportban. Két nagy csoportba oszthatóak: az aminosav transzporterek (amino acid transporter family, ATF) és az aminosav poliamin kolin (amino acid polyamine choline transporter family, APC) típusú transzporterek családjára. (Wipf et al, 2002) Mint a legtöbb növény esetén, az elsőként leírt *Arabidopsis* aminosav transzportereinek többsége – az *Arabidopsis*-ban 46 fehérje – is az ATF szupercsaládba tartozik általában széles spektrumban semleges és kationos jellegű aminosavakat transzportálnak (11. ábra). Élesztőből származó, hét ATF típusú aminosavtranszporter közül négyet vakuoláris transzporterként is leírtak. (Wipf et al, 2002)



11. ábra *Arabidopsis thaliana* aminosav és poliamin transzporterek (tpt) Wipf et al, 2002 alapján. *AtAAP*: aminosav-permeázok, *AtProT*: prolin tpt, *AtLHT*: lizin-hisztidin tpt, *AtANT*: aromás és neutrális aminosav tpt, *AtAUX*: auxin tpt, *CAT*: kationos aminosav tpt. *TM*: transzmembrán, *ATF*: Aminosav transzporter szupercsalád, *APC*: Aminosav-poliamin-kolin szupercsalád.

Az APC transzporterek, melyek lényegesen kisebb irodalommal bírnak, mint az ATF transzporterek, csak funkcionálisan hasonlók az ATF transzporterekhez, struktúrájukban eltérnek azoktól. Az a tény, hogy az APC fehérjék pro- és eukariótákban egyaránt előfordulnak, arra enged következtetni, hogy evolúciósan korán megjelent gének termékeiről van szó. Legtöbbjük jellemzően 12-14 TM doménnel bír, heterodimert képez, melyet plazmamembránhoz rögzítő alegység egészít ki. Protonfüggetlen, obligát, a membrán mindkét oldala felé aktív aminosav transzporterek. (Verrey et al, 2004) A teljes Arabidopsis genomban 14 APC-típusú fehérjét kódoló gént határoztak meg, a fehérjék közül 9 transzporter 14 TM doménnel, 5 pedig 12 TM doménnel rendelkezik. (CAT1-CAT9). Jóllehet, az APC-típusú fehérjék az ATF transzporterekkel szemben az emberi szervezetben és az élesztőben domináns szerepet töltenek be, növényekben működésük molekuláris szinten kevésbé ismert (Su et al, 2004).



12. ábra A CAT fehérjék filogenetikai származása, a *Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b 10* (Sinaur Associates, Sunderland, MA) segítségével. Látható, hogy a CAT fehérjék négy nagyobb filogenetikai alcsoportot képeznek a szekvenciaelemzésük alapján. Verrey et al, 2004 és Wipf et al, 2002 alapján.

Az eddig ismert CAT fehérjék 14 transzmembrán doménnel rendelkeznek. Filogenetikusan közel állnak egymáshoz, kisebb alcsoportokat képezve (12. ábra). Génexpressziós analízisük során kiderült, hogy szárban, virágban, gyökérben, levélben egyaránt kifejeződnek – a CAT2 a legerősebben és a CAT7 a leggyengébb mértékben, – alátámasztva azt az elméletet, hogy a CAT gének meglete kulcsfontosságú az összes sejt normális működése szempontjából. Kivételt képez a CAT6, melynek transzkriptumait csak

a gyökerekben találták meg. A CAT5 és a CAT8 a plazmamembránban, míg a CAT2 a tonoplastban lokalizált.

A többféle, nitrogénforrást felhasználni képtelen 22-delta-8AA élesztőtörzssel végzett kísérletek rávilágítottak a CAT fehérjecsalád több tagjának transzportmechanizmusokban betöltött szerepére. A CAT1 (régebbi nomenklatúra szerint AAT1 aminosav transzporter, Frommer et al, 1995) és a CAT5 közel azonos módon, elsősorban bázikus aminosavak nagy affinitású transzportereként működik, de kisebb mértékben megfigyelhető volt, hogy neutrális és savas karakterű aminosavakat is szállít. Toxikus aminosavakkal történt kezeléseket vizsgálva a CAT fehérjék működését. Feltételezhető, hogy a CAT3, CAT6 és CAT8 inkább a semleges és savas karakterű aminosavakat transzportálja. A CAT4 fehérje működését, mely a CAT2, CAT7, CAT9 és PotE putreszcin transzporterhez leginkább hasonló, eddig még nem vizsgálták részletesen.

Mindezek alapján feltételezhattük, hogy a *Conyza canadensis* (L.) Cronq. esetén is valamilyen, többféle poliamin transzportjára alkalmas rendszer is kulcsfontosságú szerepet játszik a rezisztencia mechanizmusában.

## CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi eredményeink és irodalmi adatok arra utaltak, hogy a rezisztencia nem a korlátozott penetráció illetve az antioxidáns enzimrendszer fokozott működésének eredménye. A paraquat bejut a sejtbe, ott kifejti hatását, de a rezisztens biotípus esetén egy átmeneti gátlást követően az inaktív partikulumba, a vakuolumba kerül és az életképességet jellemző értékekben helyreállást tapasztalunk. A folyamatban – mint ez korábbi kísérleteink igazolták – nem ABC-transzporterek vesznek részt és a rezisztencia jelenségét az alkalmazott biotípusban kizárólag a paraquat kezelés hatására tapasztaltuk.

Kutatómunkám céljaként a *Conyza canadensis* (L.) Cronq. magas fokú paraquat rezisztenciájának háttérében álló molekuláris mechanizmus feltárását jelöltem ki.

Ezért meg kívántam határozni, melyek azok a rezisztencia gének illetve egyéb, ABC-transzporterektől különböző molekuláris rendszerek, melyek a paraquat szekvesztrációs mechanizmusában részt vesznek.

Célul tűztem ki azon gének meghatározását is, melyek aktivitásukkal az átmeneti gátlási fázisban a védekezést biztosítják.

A rezisztencia kialakításában kulcsfontosságú gének meghatározásán túl expressziójuk változását is vizsgálni kívántam.

A molekuláris biológiai eredményeket *in silico* szerkezelelemzéssel, homológiaikutatással illetve molekuláris törzsfák elkészítésével kívántam alátámasztani.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### A NÖVÉNYEK NEVELÉSE

A repce (*Brassica napus*) és betyárkóró (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.) paraquat-rezisztens és paraquatra érzékeny biotípusú növényeit laboratóriumi körülmények között neveltük, 130 mol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> fény mennyiség, 16 órás fényperiódus és 22-25°C hőmérséklet mellett, vízkultúrában, ¼ erősségű Hoagland-tápoldaton.

A betyárkóró esetén transzportmechanizmusok vizsgálatára 3-4 hónapos, 8-10 tölevéllel rendelkező, rozetta állapotú növényeket használtuk fel, a molekuláris biológiai kísérletes munkák során 3-4 hetes példányokat alkalmaztunk. A repce esetén 2-3 hetes példányokat használtunk.

### A NÖVÉNYEK KEZELÉSE

A paraquatkezelést az ICI Agrochemicals Gramoxone nevű, 20% hatóanyag-tartalmú készítményével végeztük csapvízben feloldott, 5·10<sup>-4</sup> M hatóanyag koncentrációban.

A vakuoláris H<sup>+</sup>ATP-áz gátló kálium-nitrátot (Muller és Taiz, 2002) 10<sup>-2</sup> M koncentrációban alkalmaztuk. A gátlót 1 órával a paraquat kezelés előtt (0h) juttattuk a növényekre, majd ezt követően óránként megismételtük a nitrát metabolizációja miatt.

### FUNKCIONÁLIS AKTIVITÁS MÉRÉSE

A funkcionális aktivitást a klorofill-a-nak változó fluoreszcenciája alapján határoztuk meg és a változó és a maximális fluoreszcencia hányadosával (Fv/Fm érték) jellemeztük. A kinetikai mérések során a rozetta állapotú *Conyza* növényekből a gyártó ajánlásának megfelelő méretű mintákat használtuk fel. A sötétadaptáció 10 percig tartott, ezt követően alacsony fényintenzitású (1 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>), 1600 Hz frekvenciájú vörös fényvel gerjesztettük. A méréseket impulzus amplitúdó modulált fluoriméterrel (Walz, Effeltrich, Németország) végeztük. Az emittált fluoreszcenciát detektáló fotodióda a jelet szaggatottan, a mérőfényvel szinkronizáltan, szelektíven erősítette és mérte. A maximális (F<sub>m</sub>) fluoreszcencia értéket telítési intenzitású (kb. 7500 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>), fehér fényfelvillanást követően kaptuk meg (fényforrás: Schott KL 1500 Electronic).

## DEZOXI-RIBONUKLEINSAV KINYERÉSE

A dezoxi-ribonukleinsav a PlantDNAzol reagenssel (Invitrogen, USA) az alábbi, módosított protokoll alapján végeztük. 0,1g friss tömegű növényi mintát folyékony nitrogénben elporítottunk, majd 300 µl DNAzol oldatban feltártuk. 300 µl kloroform hozzáadása és 1 perc extrahálás után 12000g 10 perc centrifugálással választottuk el a fázisokat. A különválasztott, felülúszó vizes fázishoz 225 µl 100% etanollal precipitáltuk a DNS-t. 5000g 4 perc centrifugálás után a csapadékot 300 µl DNAzol-etanol oldattal mostuk, majd újabb 5000g 4 perc centrifugálás után a csapadékot 300 µl 75% etanollal mostuk, és újra centrifugáltuk 5000g 4 perc időtartamig. Az utolsó 300 µl 75% alkoholos mosási fázis és centrifugálás ismétlése után a képződött DNS csapadékot 50 µl molekuláris biológiai tisztaságú vízben vettük fel, a koncentráció meghatározása után a DNS oldatot a PCR reakcióban használtuk fel.

## RIBONUKLEINSAV KINYERÉSE

A ribonukleinsav kinyerését a GenoVision gyártó GenoPrep™ DirectmRNA Kit segítségével végeztük, a gyártó ajánlott preparációs eljárását részben módosítva. A mintavétel a három hetes rozetta állapotot elért növények leveleiből.

0,3 g friss tömegű levelet folyékony nitrogén segítségével elporítottunk, majd 1,2 ml izoláló pufferban, 30mp 700rpm rázatás mellett feltártuk a növényi szöveteket. 5 perces 5000g 4°C-on történő centrifugálással elválasztott felülúszót leszívtuk, majd 70 µl mágneses gyöngy oldatot adtuk hozzá. 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, óvatos forgatás mellett. Az RNS gyöngyökhöz kötődését követően 5 perc mágnesezés után 700 µl mosópuffer (Washing Buffer I) segítségével mostuk. Ismételt mágnesezést követően ezt a lépést megismételtük. Ezután 700 µl másodlagos mosópuffer (Washing Buffer II)-vel mostuk, mely lépést szintén megismételtük. Ezt követően 20 µl eluációs folyadékot (Elution Solution) oldatot adtunk a gyöngyökhöz, és 65°C -on, 2 perces eluációval választottuk le a gyöngyök felületéről az mRNS pool-t. Az eluálás után 4°C-os jégre helyeztük 5 percig, majd a koncentráció meghatározása után azonnal felhasználtuk a reverz transzkripció során.

## REVERZ TRANZKRIPCIÓ, cDNS KÉSZÍTÉSE

A GenoVision GenoPrep™ DirectmRNA készlettel preparált mRNS poolból a cDNS készítését a Fermentas cég RevertAid First Strand PCR Synthesis kitjével végeztük az alábbi oligo dT primerekkel:

```
H-T11-M: 5'-HTT TTT TTT TTT M-3'  
H-T11-N: 5'-HTT TTT TTT TTT N-3'  
H-T11-A: 5'-HTT TTT TTT TTT A-3'  
DLP4: 5'-C ACT ATA GGG AAG CTT TTT TTT VT-3'  
DLPG: 5'-C ACT ATA GGG AAG CTT TTT TTT GN-3'  
DLFA: 5'-C ACT ATA GGG AAG CTT TTT TTT AN-3'  
DLFC: 5'-C ACT ATA GGG AAG CTT TTT TTT CN-3'
```

A gyártó által ajánlott protokollt módosítottuk az alábbiak szerint: 11 µl DEPC vízben oldott, 1 µg RNS-t 1 µl 0,5 µg/µl koncentrációjú oligo (dT) primerrel, 100 µl-es PCR csövekben inkubáltuk 70°C-on 5 percig. A mintákhoz 4 µl reakciópuffert (Reaction Buffer), 1 µl RNáz inhibitor, 2 µl dNTP-t adtunk, majd inkubáltuk 37°C-on 5 percig, 1 µl M-MuLV reverz transzkriptáz enzimmal végeztük a reverz transzkripciót, 60 percig 42°C-on majd 10 percig 70°C-on inkubáltuk a mintákat. A reakció végeztével 4°C-ra helyeztük a mintákat. Az elkészített cDNS poolt -20°C-on, fagyasztott állapotában legfeljebb 1 hétig tároltuk.

## DIFFERENTIAL-DISPLAY-RT-PCR

A cDNS felszaporítása PCR reakcióban a GenHunter Corp. gyártó protokoll útmutatásai nyomán 4 µl cDNS felhasználásával az alábbi univerzális primerekkel (H - Arbitrary Primer, HAP 1-8) történt:

```
HAP 1: 5' -AAG CTT GAT TGC C-3'  
HAP 2: 5' -AAG CTT CGA CTG T-3'  
HAP 3: 5' -AAG CTT TGG TCA G-3'  
HAP 4: 5' -AAG CTT CTC AAC G-3'  
HAP 5: 5' -AAG CTT AGT AGG C-3'  
HAP 6: 5' -AAG CTT CGA CCA T-3'  
HAP 7: 5' -AAG CTT AAC GAG G-3'  
HAP 8: 5' -AAG CTT TTA CCG C-3'
```

## A FRAGMENTEK ELVÁLASZTÁSA ÉS VISSZAIZOLÁLÁSA

A DDRT-PCR termékek elválasztása állandó 55W futási teljesítménnyel történt (Bio-Rad DNA Sequencing System, USA), 0,4 mm vastag, 6%-os denaturáló 24:1 akrilamid - bisz-akrilamid arányú poliakrilamid gélen. A gél előhívását, ezüst-nitráttal festését a Silver Sequence® DNA Sequencing System gyártója, a Promega előírásai szerint végeztük. A 4 független kísérletben megjelent csíkokat kivágtuk, 100 µl molekuláris biológiai célra megfelelő tisztaságú vízben forraltuk 20 percig, majd a megfelelő HAP1-8 és oligo-dT primerekkel, a GenHunter „cDNS recovery” PCR protokollja szerint szaporítottuk fel, negyedére csökkentett dNTP mennyiség mellett (Liang és Pardee, 1998).

## A FRAGMENTEK KLÓNOZÁSA ÉS SZEKVENÁLÁSA

Az újra felszaporított fragmentek elválasztása 1,5%-os TAE pufferral készített agaróz gélen történt. A visszaizolálás a Millipore DNA Gel Extraction Kit-jével történt. A klónozás pGEM-T Easy (T/A cloning, Promega pGEM-T® Easy Vector System II.) vagy pBluescript vektorba (blunt end cloning, Stratagene, USA) ill. JM-109 kompetens sejtekbe történt. A plazmid DNS-t alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk (Sambrook et al. 1989), az inszert meglétét EcoR1 és BstZ1 restriktációs hasítással erősítettük meg. A pozitív klónok tisztítása a QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) felhasználásával történt a szekvenálást megelőzően. A szekvenálás közvetlenül a plazmidból az ABI BigDye® Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 Kit (Applied Biosystems, USA) segítségével történt M13 primerekkel, 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) készüléken.

## PRIMERTERVEZÉS

A primerek tervezését az alábbi web-alapú alkalmazásokkal végeztük:

SGD Web Primer <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>  
Primer3 [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

A tervezett primerek *in silico* validálását hajtjuképződésre, dimerképzési hajlandóságra nézve az alábbi web-alapú alkalmazásokkal végeztük:

GeneWalker <http://www.cybergene.se/primerdesign/genewalker/genewalker11.html>  
IDT Oligo Analyzer® <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>

Az PCR és RT-PCR reakciók során alkalmazott primerek a következők voltak:

|                    |                                      |
|--------------------|--------------------------------------|
| ACTIN2 forward     | 5'-GTG GGAS ATG GAA GCT GCT GG-3'    |
| ACTIN2 reverse     | 5'-GAC CTG CCT CAT CAT ACT CGG-3'    |
| FERRITIN2a forward | 5'-GGG GAT ACA TCG TCA TGC TTC-3'    |
| FERRITIN2a reverse | 5'-GTG ATC AAA CTC AGA CAA CGG C-3'  |
| FERRITIN2b forward | 5'-TGT GTA CCA TGC TAT GTA TGC-3'    |
| FERRITIN2b reverse | 5'-CTT TAC ATT TGA CGT CTC TGG-3'    |
| CAT4 forward       | 5'-ACG GAC CAT CGTCAT CTT AGT CGA-3' |
| CAT4 reverse       | 5'-AAC CCT AGT ATA GAT TAC CAG-3'    |

A kationos aminosavtranszporter direkt amplifikáláshoz a további primereket terveztük:

|               |                                   |
|---------------|-----------------------------------|
| CATJ1AF (fwd) | 5'-GGA CAA CAA TTG GAG CAG G-3'   |
| CATJ1AR (rew) | 5'-CGC ATA ATG ATA AGC ACT CCC-3' |
| CATJ1F:       | 5'-AAA ACG ATG GAC CTC ATC AGC-3' |
| CATJ1R:       | 5'-CCA AGG TGC AAA CAT TCA C-3'   |
| CATJ2F:       | 5'-TGA ATG TTT GCA CCT TGG-3'     |
| CATJ2R:       | 5'-TAG CAC ACA GAC TGC AAC G-3'   |
| CATJ3F:       | 5'-AGG CAC TCT AAT GGC ATT C-3'   |
| CATJ3R:       | 5'-CAA GTC ATT GTG GGA ACG-3'     |



## PCR REAKCIÓ

A DNS amplifikáló PCR reakció során 1 ng templát DNS-t tartalmazó oldatot használtunk fel, az 50 µl végtérfogatú reakcióelegyet az alábbiak alapján mértük össze molekuláris biológiai tisztaságú vízben.

|   |                        |
|---|------------------------|
| 10x Taq puffer                          | 1x                     |
| 2mM dNTP mix                            | 0,2 mM nukleotidonként |
| Forward primer                          | 1µM                    |
| Reverse primer                          | 1µM                    |
| Taq DNS polimeráz (Fermentas, Litvánia) | 1,25unit               |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>                  | 2mM                    |

A PCR reakciót az alábbi protokoll alapján Techne 512 (Techne, USA) thermal cycler készüléken végeztük el:

| PCR-lépés    | °C     | Ciklusok száma | Időtartam |
|--------------|--------|----------------|-----------|
| Denaturáció  | 95     | 1              | 5 perc    |
| Amplifikáció | 95     | 10             | 15 mp     |
|              | 60-54* |                | 45 mp     |
|              | 72     |                | 45 mp     |
| Amplifikáció | 95     | 35             | 15 mp     |
|              | 56     |                | 45 mp     |
|              | 72     |                | 45 mp     |
| Termináció   | 72     | 1              | 10 perc   |

\* ciklusonként 0,6°C-kal csökkentve a hőmérsékletet

## SZEMIKVANTITATÍV RT-PCR REAKCIÓ

A szemikvantitatív RT-PCR Su et al (2004) kidolgozott módszere alapján történt, az alábbi módosításokkal Techne 512 (Techne, USA) thermal cycler készüléken:

| PCR-lépés    | °C     | Ciklusok száma | Időtartam |
|--------------|--------|----------------|-----------|
| Denaturáció  | 95     | 1              | 5 perc    |
| Amplifikáció | 95     | 10             | 15 mp     |
|              | 60-54* |                | 35 mp     |
|              | 72     |                | 35 mp     |
| Amplifikáció | 95     | 35             | 15 mp     |
|              | 56     |                | 35 mp     |
|              | 72     |                | 35 mp     |
| Termináció   | 72     | 1              | 10 perc   |

\* ciklusonként 0,6°C-kal csökkentve a hőmérsékletet

Konstitutív, állandóan expresszálódó, konzervatív háztartási géneként az aktin 300 bázis hosszú szakaszát vettük.

## IN SILICO ELEMZÉSEK

A bioinformatikai elemzések során több fajtól származó nukleotid- és fehérjeszekvenciákkal dolgoztunk. A fajok nevei és a szekvenciák listája, azonosítószámokkal együtt az 1. számú függelékben található meg. A felhasznált szekvenciák a GenBank, EMBL, PDB és a SwissProt (később UniProt) adatbázisokból származnak. A szekvenciakereséseknél és összehasonlításoknál a BLAST (blastn, blastx, tblastx) 2.2.8 algoritmust használtuk. (Altschuh et al, 1997). Az adatbázisok elérhetőségét az 5. táblázat tartalmazza.

| Adatbázis neve   | Internetes elérhetőség (URL)                                   | Adatbázis jellege   |
|------------------|--|---|
| <b>GenBank</b>   | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> | Elsődleges nukleotid adatbázis, fehérje-transzlátumok                 |
| <b>EMBL</b>      | <a href="http://www.ebi.ac.uk/embl">www.ebi.ac.uk/embl</a>     | Elsődleges nukleotid adatbázis, fehérje-transzlátumok                 |
| <b>PDB</b>       | <a href="http://www ww p d b . o r g">www.wwpdb.org</a>        | Nukleotidszekvenciák és fehérjék 3D strukturális adatbázisa,          |
| <b>SwissProt</b> | <a href="http://www.expasy.org/sprot">www.expasy.org/sprot</a> | Hiearchikusan rendezett, magasan annotált fehérjeszekvencia adatbázis |
| <b>UniProt</b>   | <a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a>           | Egységesített, redundanciakerülő fehérjeszekvencia adatbázis          |

5. táblázat Az in silico elemzések során használt bioinformatikai adatbázisok

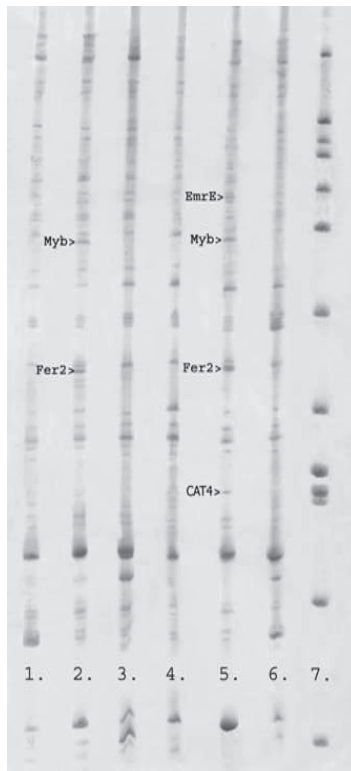
Az elemzések során a szekvenciákat FASTA formátumban alkalmaztuk (Hingap et al, 1999). A szakaszok megjelenítéséhez, rendszerezéséhez és elemzéséhez a BioEdit programcsomag 5.09-es verzióját használtuk. A szekvenciaillesztéseket a CLUSTALW (Thompson et al, 1997) alapértelmezett beállításaival végeztük, mely a BioEdit programcsomag részét képezi (Tippman, 2004). Az aminosavszekvenciák karaktereinek (negatív és pozitív töltöttség, amin és alkohol, alifás és aromás, kis méretű és kéntartalmú oldalláncok befolyása) elemzésénél és az ábrázolás során a Genedoc programcsomagot is igénybe vettük (Nicholas and Nicholas, 1997). Az illesztéseket Genedoc-ra jellemző \*.msf és Bioedit által előnyben részesített \*.gb és \*.fas fájltypusban tároltuk. A filogenetikai törzsfát PAUP 4.0 szoftverrel készítettük el a neighbor-joining módszerrel elvégzett evolúciós távolsági adatokból (Swofford, 2001). A konzervatív régiókat az NCBI Conserved Domain Search <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> adatbázisban kerestük (Marchler-Bauer és Bryant, 2004). A TM domének elhelyezkedésének előrejelzése során a TMNMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) szoftvert használtuk.

## EREDMÉNYEK

### DDRT-PCR

A kísérletek során a elsődleges feladatomban annak a kérdésnek a megválaszolása volt, hogy mely gének vesznek részt a *Conyza canadensis* (L.) Cronq. paraquat-rezisztenciájában. Ezért elsőként a paraquat kezelésre indukálódó géneket határoztuk meg, Differential Display PCR technika segítségével. Ennek érdekében, hogy a paraquatra adott specifikus válasz során indukálódó géneket el tudjuk különíteni az általános reaktív oxigénformák okozta stresszválasztól, az expressziós különbségeket mindkét biotípusban, paraquat és szuperoxid-anion gyök generáló menadion kezelés után vizsgáltuk.

A kezelésekre hatására mindkét biotípusban több új kifejeződő részszekvencia, *expressed sequence tag* (EST) megjelenését tapasztaltuk, ami kezelésre indukálódó géneket jelez. A menadionkezelés lehetővé tette, hogy kizárjuk azokat a fragmentumokat, melyek reaktív oxigénformák okozta általános stressz válasz esetén is megnövekedett génkifejeződést mutatnak, így egyedül a paraquat hatására expresszázó fragmentumokra koncentrálhattunk. A fragmentumok tisztítását és klónozását szekvenálás követte, ami által meghatározhatóvá váltak az egyes EST-k szekvenciái (13. ábra).



13. ábra A szenzitív (S) és rezisztens (R) biotípus Differential Display RT-PCR mintázata paraquat (pq) és menadion (men) kezelést követően. Az izolált sávokat nyílak jelölik. 1.: S kontroll; 2.:  $5 \times 10^4$  M pq 3.:  $5 \times 10^3$  M men 4.: R kontroll, 5.:  $5 \times 10^4$  M pq 6.:  $5 \times 10^3$  M men 7.: DNS marker

A DDRT-PCR gélből kinyert szakaszok szekvenálása után, azokat az adatbázisokkal összevetve négy EST-t azonosítottunk (6. táblázat). Ebből kettő a szenzitív és rezisztens biotípusból származó mintákban is hasonló mértékben megnövekedett expressziós szintet mutatott a kezelés hatására. A hasonlósági keresések után a 189 nukleotidnyi EST-t MYB transzkripciósi faktorként, a 373 nukleotidnyit pedig az AtFerr2-vel mutatott hasonlósága alapján ferritinként azonosítottuk.

A másik két gén lényegesen magasabb expressziós szintet a paraquattal kezelt rezisztens mintákban. Ezek közül az egyik, 149 nukleotidnyi fragmentum a CAT4 aminosav transzporterrel mutatott egyezést, a másik, 276 nukleotidnyi a vakuoláris H<sup>+</sup>ATP-ázokkal tűnt homológoknak.

| Név                | Hossz | S | R | Szekvencia  |
|--------------------|-------|---|---|---|
| <b>MYB</b>         | 189   | + | + | >Feltételezett MYB szekvencia, kromatogram alapján<br><br>TGACGTAACACAATCTTTCTACGTGTTCTCTTTTATTCCTGACCATCATCATACCATAGTTTATAGGTTTCIGTTGCTTTTCTTTCTACTGCAGCTTCATGCTTCTCATCCTTTTGTCTCATCACGATGGCTAGCAGCTGCCTTAGTGCTGCCTCCATTAGTCTTGTAGTTAGGGAATGCCATTA   |
| <b>FER</b>         | 373   | + | + | >Feltételezett FER szekvencia, kromatogram alapján<br><br>GTTCTATGTGTCCATGCCTATGTATGCCTTACTTTGATAGCAGCATAATGTAGCTCTCAA<br>GGGATTAGCCAGTTTTTTAAGGAGTCTAGTGAAGAGGAAAGGGAACATGCTGAAAAGTT<br>TATGGAATACCAGAACAAACCTGGTGGTAAGTGAAATTACAATCTATTTGATGCCGTT<br>GTCGAGTTTATCAGCTGAGAAAGGGGATGCACCTTATGTATGGAGCTTGCATTGTC<br>ATTGGAGAAATTGACAAATGAGAACTTCTACATGCCATGCCGTGGCCACCAAGAACAA<br>TGATGTGCAATTGGCTGATTTTGTGAAAGCGAGTCTTGGTGAACAGGTTGAGGCAAT<br>CAGAAAAATCTCA |
| <b>CAT</b>         | 149   | - | + | >Feltételezett CAT szekvencia, kromatogram alapján<br><br>TGGACAACAATTGGAGCAGGAGTGATATTTAGTGGGAACAGTAGCTAGACAACACACA<br>GGACCTGCTCTTGCTGTATCATCTTTCATCGATGGAGTAGCAGTCTCTCCGCTGTG<br>AGCTATGCTGAGCTTGTCTCTCGTTGCTC   |
| <b>EmrE / DET3</b> | 276   | - | + | >Feltételezett vakuoláris H-ATPáz szekvencia, kromatogram alapján<br><br>TGTGTTTTCCAGCCTAGCAGTAGACTCATATGAGATTAATGGTGAACGAGACATAAGGA<br>TGAGTGCAGCATCACCACCTAAGCCACCATATTTCCATCGTCATCCGTTTCCAGAAC<br>GTGCTGTAGAACTGTCAGATAGAGTTTCTAGGATGGAACGACTTCTTCTCACTCTTC<br>ACAGATGGTGACAACACACAGACTGAAATAAACAAAATAATCTGTAATAAATAATAAAGG<br>ATAGTAAAAATGCCACGGGAAAGAGAGTCAAGA   |

6. táblázat Paraquat kezelés hatására megjelenő EST-k szekvenciái



## POLIAMIN TRANSPORTEREK *IN SILICO* VIZSGÁLATA

A kapott fragmentumunk nagyfokú hasonlósága alapján *in silico* vizsgálatokat végeztünk a növényi poliamin- és kationos aminosavtransporterek között, alátámasztandó a hasonlósági keresés eredményeit (16. ábra). Meghatározásuk kiindulópontjaként az *E. coli* PotE génje által kódolt fehérje szekvenciáját vettük. (Igarashi és Kashiwagi, 1999, Tomitori et al, 1999, Tomitori et al, 2001)

A PotE, ősi jellegű poliamin transzporter fehérje térszerkezetéhez hasonlót találtak az élesztőben is, így várható volt, hogy hasonló többféle poliamin és aminosav transzportjára képes rendszereket a növényi genomokban is találunk.

Rendkívül fontos ismét kiemelni, hogy a PotE-vel homológ TPO fehérjét élesztősejtben fokozott mértékben expresszálva megnövekedett paraquatrezisztenciát tapasztaltak. Ezen kívül a PotE fehérjén putreszcin-kötőhelyet sikerült lokalizálni, amely hasonlóság a poliamin-transzportfolyamatokra és a paraquat-rezisztenciára nézve kulcsfontosságú (Tomitori et al, 2001, Uemura et al, 2005).



A PotE-vel homológ illetve ortológ fehérjéket az NCBI BLASTP programjával detektáltuk a növényi genomokban. Ez az alkalmazás az illesztéseknél jobban figyelembe veszi a lokális hézagokat, tehát a hasonlósági kereséseknél alkalmazott helyettesítési mátrix lehetővé teszi a divergálódott szekvenciák jobb illesztését. Az inkább lokális, mint globális illesztések jobban a figyelembe veszik a strukturális és funkcionális hasonlóságot. A program grafikus kimenetele és kapcsolódási pontjai könnyebb áttekinthetőséget biztosítanak. Feltétel volt, hogy a várhatósági érték (expecting rate, E) minél kisebb maradjon, ezért a statisztikai határnak elfogadott 0.05-ös értéknél nagyobb E értékeket már nem vettük figyelembe. A keresést standard BLOSUM 62 helyettesítési mátrix-szal végeztük a növényeken (*Viridiplantae*) belül. Az eredmények azt mutatták, hogy a PotE-hez a növényi genomokból leginkább a CAT4 *Arabidopsis thaliana* genomból származó gen hasonlít, melyhez a DDRT-PCR kísérletünk CAT fragmentuma is hasonlított (7. táblázat).

| gi Azonosító   | Acc.szám    | Meghatározás                                     | Pontszám | E érték |
|--|-------------|--|----------|---------|
| <b>Szignifikáns hasonlóságot mutató fehérjék</b>         |             |  |          |         |
| gi:22330822  | NP_187022.2 | CAT4 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 63,2     | 5,0E-10 |
| gi:18390592  | NP_563754.1 | CAT9 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 59,7     | 7,0E-09 |
| gi:30696198  | NP_849822   | CAT2 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 56,6     | 5,0E-08 |
| gi:30693001  | NP_198510.2 | CAT3 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 53,1     | 6,0E-07 |
| gi:15238312  | NP_196097.1 | CAT6 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 47,0     | 4,0E-05 |
| gi:30685317  | NP_193844.2 | CAT1 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 43,9     | 4,0E-04 |
| gi:15220035  | NP_173155.1 | CAT8 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 41,6     | 2,0E-03 |
| <b>Kevésbé szignifikáns hasonlóságot mutató fehérjék</b> |             |  |          |         |
| gi:15226868  | NP_181041.1 | CAT5 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 35,8     | 8,6E-02 |
| gi:18400079  | NP_566460.1 | Aminosav permeázok<br>családjába tartozó feh.    | 33,5     | 4,8E-01 |
| gi:15228334  | NP_187671.1 | CAT7 kationos aminosav tpt,<br><i>A.thaliana</i> | 33,5     | 5,1E-01 |

7. táblázat A PotE prokarióta poliamin transzporterhez szekvenciájukban szignifikáns hasonlóságot mutató növényi transzporterek. Szignifikáns a hasonlóság, amennyiben az E várhatósági érték 5,0E-02 alatt marad. Amennyiben E meghaladta az 5,0E-01 értéket, a hasonlóságot elvettem.



A PotE-vel mutatott homológiát egyéb, páros hasonlításokkal is alá kívántuk támasztani, ehhez az NCBI Pairwise BLAST felületét választottuk. A két fehérje hasonlóságát többféle helyettesítési mátrixokkal is ellenőriztük, mivel a BLOSUM és a PAM algoritmus más-más aminosav-cserékre érzékeny. A pontozást és a számszerű eredményeket a [8. táblázatban](#) tüntettem fel.

| Helyettesítési mátrix | pontszám   | E érték  | egyezés      | pozitív tal.  | hézag       |
|-----------------------|------------|----------|--------------|---------------|-------------|
| <b>BLOSUM50</b>       | 55,2 (181) | 3,00E-06 | 77/378 (20%) | 159/378 (41%) | 33/378 (8%) |
| <b>BLOSUM62</b>       | 61,2 (147) | 4,00E-08 | 75/378 (19%) | 158/378 (40%) | 33/378 (8%) |
| <b>PAM250</b>         | 45,8 (154) | 2,00E-03 | 65/330 (19%) | 139/330 (41%) | 21/330 (6%) |

8. táblázat *Prokarióta PotE és Arabidopsis CAT4* páros illesztése, eltérő helyettesítési mátrixokkal

Grafikusan egyértelművé válik az egyezés: minél inkább lineáris a vonal, annál magasabb fokú az egyezés ([17. ábra](#)).



17. ábra *E.coli PotE és Arabidopsis CAT4* páros illesztése, eltérő helyettesítési mátrixokkal. Az X tengelyen az *Arabidopsis*-ből, az Y tengelyen a *Coli*-ből származó fehérje szekvenciáját ábrázoltuk.

A PotE és CAT4 elsődleges szerkezetéből eredő homológiák feltárása után a másodlagos szerkezeti jellegek feltárását végeztük el a SWISS-PROT oldalán található analitikai szoftverek segítségével (18. ábra).

|                      |                       |                 |            |          |         |                          |
|----------------------|-----------------------|-----------------|------------|----------|---------|--------------------------|
|                      | HEE                   | HHHHHHHHHHHEEEE | EE         | EEEEEE   | E       | EEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH |
| EEEEEE               | HHHHHHHHHEEEEE        | EE              | HHHHHHHEEE | EE       | HHHH    | EEE HHHHHHHHEEEEE        |
| E                    | EEEEEEEE              | EEEEEEEE        | EE         |          | EE      | EEEEEEEE EE H H EEE      |
| EHHHHHHEEEEEEE       |                       | E               | HHHHHEE    | EHHHHHHH | HHHHHHH |                          |
| EEEEHHHHHHHHHHHHHHHH | HHHHH                 | EEHHHHHHHHHE    |            | E        | H       | HHHH                     |
|                      | HHHHHHHEEEEEH H HHHHH |                 | EEEE       | EEEE     | EEEE    | H E                      |
|                      | EEHHHEEEH EEEEE       | H               |            |          |         | EEEE EEEEE               |

18. ábra A CAT4 másodlagos struktúrája a SWISSPROT szoftverelemzése alapján. (H=hélix, E=lánc, \_ = nincs előrejelzés)

A transzporterek *in silico* elemzése során központi kérdésnek tekintettük a szubsztrát kötőhelyek meghatározását. Mivel a paraquat és a putreszcinn töltésseloslása hasonló, az elemzés során a potenciális putreszcinkötő-helyeket kívántuk feltérképezni a transzmembrán domének meghatározásával. Az ábrákon az elsődleges szerkezetből előrejelzett transzmembrán doméneket a piros, a citoplazma felé eső aminosavszekvencia részeket a kék, míg a külső tér felé néző régiókat a lila szín jelöli. A belső tér felé néző régiókban található glutaminsavakat zöld nyilak jelölik. A transzmembrán domének elemzését elvégeztük az összes *Arabidopsis* CAT, az *E. coli* PotE, az *Ochrobactrum* PqrA és az élesztő TPO1 génterméke esetén (2.sz. függelék).

Mutáns *E. coli* törzseken végzett korábbi kísérletek igazolták, hogyha a PotE Glu<sup>77</sup>, Glu<sup>277</sup>, illetve Glu<sup>433</sup> pozíciójú glutaminsav módosul, akkor a putreszcinn felvétel jelentős mértékben csökken, így elmondható, hogy mindhárom aminosav részt vesz a PotE putreszcinn kötőhelyének kialakításában. (Igarashi és Kashiwagi, 1999) A kötőhelyekben résztvevő glutaminsavak (zöld nyíl) az N-terminális felől haladva a II., a VI. és a XII. transzmembrán domént (piros szín) követő citoplazma felé néző hidrofíl részen (kék szín) találhatóak meg (2.sz. függelék).

Az élesztőből származó TPO1 hasonló térszerkezettel bír: a putreszcinn-ornitin antiporter ligandkötőhelyét kialakító három glutaminsav, a Glu<sup>207</sup>, a Glu<sup>324</sup> és a Glu<sup>574</sup> itt is a II., a VI. és a XII. transzmembrán domént követő citoplazma felé mutató, hidrofíl oldalon helyezkednek el. A TPO1 N-terminális felőli oldalán, az első transzmembrán régió előtt majdnem kétszáz aminosavnyi hosszban szerinben és treoninban gazdag régiót találunk, melyet a proteinkinázok foszforilálhatnak (Igarashi és Kashiwagi, 1999).

A fentiek alapján a kationos aminosav transzporterek családjában is olyan fehérjét kerestünk, melynél a II., VI. és XII. transzmembrán domént követő, citoplazma felé néző régióban glutaminsavakat találunk. Bár a család több tagjának N-terminálisa is a citoplazma felé néz (CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT5), közülük mégis a CAT4 az, amelyik mindhárom kritériumot teljesíti (II., VI., XII. TMD-t követő helyeken Glu). Ezt azért tartottuk fontosnak meghatározni, mert így könnyebben kialakítható az a specifikus töltéseloszlással és kötési távolságokkal bíró térszerkezet, melyhez a putreszcin, illetve adott esetben a hasonló méretű és töltéssel rendelkező paraquat képes kötődni.

A PotE fehérjével paraquat-transzport szempontjából analóg molekula, az *Ochrobactrum*-ból származó PqrA fehérjénél megfigyelhető, hogy a fehérje citoplazma felé néző régiói között is csupán háromnál találunk glutaminsavat, viszont itt egy régióon belül akár többet is: a IX.-et három, a XI-et négy is követi (V: Glu<sup>194</sup>, IX: Glu<sup>327</sup>, Glu<sup>332</sup>, Glu<sup>337</sup>, XI: Glu<sup>396</sup>, Glu<sup>399</sup>, Glu<sup>407</sup>, Glu<sup>410</sup>).

A CAT4 transzporternél is megfigyelhetjük, hogy az aminosav-transzportereknél már felsorolt régiók közül mind a VI., mind a XII. transzmembrán domént követő régióban több glutaminsav helyezkedik el: vélhetőleg a kationok számára energetikailag kedvező, kapcsolódást megkönnyítő, negatív töltésű környezet létrehozásában fontosak.

## DIREKT SZEKVENÁLÁS

*In silico* elemzések alapján a CAT4 teljesítette azokat a feltételeket, melyeket egy akár paraquat transzportjára is alkalmas növényi kationos aminosav transzporterrel szemben támasztottunk, így a további, molekuláris biológiai elemzések alkalmával a CAT4, illetve az ahhoz hasonló *Conyza*-gén paraquat transzportban betöltött szerepét kívántuk tisztázni.

Az *Arabidopsis* forrásszekvencia alapján tervezett primereket először az *Arabidopsis*-hoz rendszertanilag és genomjában is igen hasonló repcén (*Brassica napus*) alkalmaztuk, majd a szekvenálási eredményeket összevetettük a genomi adatbázisokkal. Ezek alapján kiderültek azok a régiók, melyek a rokon növényekben azonosak, illetve azok, melyek a közeli rokonokban is különböznek.

Az eredmények alapján a primerek szekvenciáját oly módon pontosítottuk, hogy feltételezhetően az *Arabidopsis*-től genomjában markánsan eltérő *Conyza*-ban is képes legyen a CAT4 szekvencia parciális szakaszát felszaporítani PCR-reakció során. A polimeráz láncreakció protokolljának optimalizálásával sikerült elérni, hogy egy 490 nukleotid hosszú, parciális szekvenciát nyertünk a repce genomialis DNS-éből.

Az ennek alapján újatervezett, pontosabban kötődő primerekkel 148 nukleotidnyi expresszáldó szekvenciárészletet amplifikáltunk a repceből nyert, reverz transzkripció során preparált cDNS poolból. Ezt a primerpárt használtuk a *Conyza* esetében, amivel hasonló hosszúságú, a CAT4-gyel majdnem teljes hasonlóságot mutató szakaszt sikerült kimutatni (19. ábra).

### A

```
>0204_A_CAT_sequence_from_repce
TG CAGACTACAGCCTTTGACTTGTGCTATGGTAATGAACTTTTTCTCCCCATTTGTGAACCAACCA
GCATTTGTGTCTCTGTC AATGTTTGTGATTTGCTTCTTAATTTTTTCAAAGGAGTTGGAACAACAAT
AGGAGCAGGAGTGTATATTTCTCGTGGGAACAGTAGCTAGAGAACAACACAGGACCTGTCTTGTCTTTCC
TTCTTCATCGCTGGAGTAGCAGCTCTCTCCGGCTGTTGTTACGCTGAGCTTGTCTCGATGTCAT
CTGCTGGCAGTGTCTTATCATTATGCTTACATATGCTCCGGAGAAGGGTATGGAATAAATGGATTCTTATG
GTAGAATTGATCTGCTTTAAAGCTGAGACTCTCTCTGTTGTTGTTTCATAAGATTGCTTGGTTGGT
TGGTTGGGCACCTGGTTGGATTATACTATTGGTGGATCAGCCATTGCACGTGGCATAACTCCAAATCTG
```

### B

```
GGAGTTGGAACAACAATAGGACAGGAGTGTATATTTCTCGTGGGAACAGTAGCTAGAGAACAACACAGGAC
CTGCTCTTGTCTGTTTCCCTTCTCATCGCTGGAGTAGCAGCTCTCTCTCCGGCTGTTGTTACGCTGAGCT
TGTCTTCTCGATGCCATCTGCTGGCAGTGTCTTATCATTATGCTTACATATGCTCCGGAGAAGGGGATTG
CTTGGTTGGTTGGTTGGGCACCTGGTTGGATTATACTATTGGTGGATCAGCCATT
```

19. ábra A, Repceből származó PCR-reakció során nyert CAT DNS szekvencia (exonok / intronok).  
B, Repceből származó RT-PCR során nyert CAT cDNS szekvencia

A szekvenciát Pairwise BLASTn elemzéssel összehasonlítottuk az *Arabidopsis* CAT4-gyel. BLOSUM62 helyettesítési mátrixot használtunk (20. ábra).

Az intronok kivágása után, aminosavra translált szekvenciát Pairwise BLASTp elemzéssel összehasonlítottuk az *Arabidopsis* CAT4-gyel, BLOSUM62 helyettesítési mátrixot alkalmazva (21. ábra).

Mint látható, a két *Brassicaceae* családba tartozó faj, a repce és az *Arabidopsis* CAT4 parciális szekvenciája nukleotid szinten több mint 90%-os hasonlóságot mutat, míg aminosav szekvenciájában teljesen egyezik.



## TRANZSPORTER-INHIBITOR (KNO<sub>3</sub>) ALKALMAZÁSA

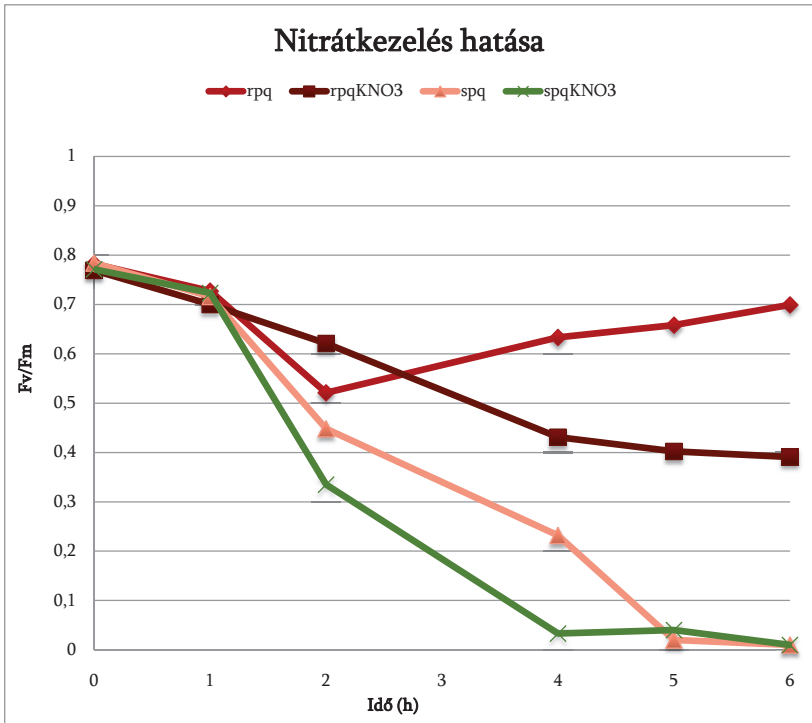
Az *in silico* vizsgálatok után meg kívántuk erősíteni hipotézisünket, miszerint a rezisztencia-mechanizmus során a paraquat a hatáshelyről metabolikusan inaktív kompartmentbe, a vakuólumba jut. A transzportmechanizmus során az aktív ágensnek akár natív, akár konjugátum formájában legalább két membránon is át kell jutnia.

Korábbi kísérleteink során kiderült, hogy az ioncsatornák membránban lokalizált (Fo) részének blokkolásával, valamint az *E. coli* paraquat rezisztenciáért felelős kis moltömegű, a transzporterek Fo régiójával homológ EmrE fehérje speciális gátlásával a helyreállítás megakadályozható (Halász et al 2002).

Jelen kísérleteink során vakuoláris protonpumpa ATP-ázokat gátló kálium-nitrátot alkalmaztunk (22. ábra). Az inhibitor hatásosnak bizonyult a helyreállítás megakadályozásában a rezisztens biotípusban. Ha a nitrátot 1 órával a paraquat kezelést követően adtuk, mintegy 50 %-ban gátolta a helyreállítás folyamatát. Többszöri nitráttal történő permetezés (1, 2, 3 és 4 órával a paraquat kezelés után), valamint a paraquattal kezelt levelek úsztatása nitrát tartalmú oldatban megakadályozza a helyreállítás folyamatát. Mivel a nitrát szelektíven blokkolja a vakuólumokban található ATP-ázokat, melyek a vakuoláris membránok energizálásában vesznek részt, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a paraquat szekvesztráció protongrádiens energiája terhére történik.

A szenzitív biotípusban korábbi adataink szerint a N<sup>4</sup>N<sup>1</sup> -diciklohexil-karbodiimid (DCCD), valamint a tetrafenil-foszfonium-klorid (TPP) 2 órával a Pq kezelés után alkalmazva csekély mértékben ugyan, de fokozta a paraquat által okozott gátlást (Halász et al. 2002).

Jelen kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a nitrát alkalmazása a szenzitív biotípusban is súlyosbítja a paraquat hatását. Mivel a szenzitív növényeknél nem figyelhető meg helyreállítás, ez a hatás úgy értelmezhető, hogy a gátlók által befolyásolt mechanizmusok mindegyike részt vehet egy korlátozott ideig a szenzitív növények általános stresszválaszának kialakításában és a paraquat transzportban .



22. ábra 10mM nitrát hatása a *Conyza canadensis* szenzitív és a rezisztens biotípusának a klorofill-a fluoreszcencia indukciójával ( $F_v/F_m$ ) jellemzett funkcionális aktivitására paraquatos kezelést ( $5 \cdot 10^{-4} M$ ) követően. A gátlót 1h-val a paraquat kezelés előtt (0h) juttattuk a növényekre, majd ezt követően óránként megismételtük a nitrát metabolizációja miatt. rpq: rezisztens kontroll; rpqKNO<sub>3</sub>: rezisztens, nitráttal kezelt; spq: szenzitív kontroll; spqKNO<sub>3</sub>: szenzitív, nitráttal kezelt; (n=15).

Összhangban a bevezetőben említett ABC-transzporter-gátlókkal végzett kísérletekkel (Halász et al, 2002) eredményeink is arra utaltak, hogy a helyreállítás folyamatában valószínűleg nem a bonyolult szerkezetű ABC transzporterek, hanem kisebb szállítófehérjék vesznek részt.

## A TELJES FERRITIN SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁSA ÉS ELEMZÉSE

A differential display RT-PCR kísérletben további fontos eredmény volt a *Conyza* ferritin gén azonosítása. A mindkét biotípusból nyert, paraquatkezelés hatására azonos expressziós szint növekedést mutató, egymással egyező EST-k mind nukleotid-, mind translált aminosav-szekvenciájukban nagyfokú hasonlóságot mutatnak más, növényi ferritin molekulákkal (23. ábra).

```

*           340           *           360           *           380           *           400           *
EST      : TCTTTCATATCT TA CARG CT ATGTATGC TA GTT GA AGAGATAAAGT GCTCT GAAGGGA TT GCCA GTTTTT AAG : 82
Nicotiana : TCTTTCATATCT TA CARG CT ATGTATGC TA GTT GA AGAGATAAAGT GCTCT GAAGGGA TT GCCA GTTTTT AAG : 410
          TCTTTCATATCT TA CARG ATGTATGC TA TT GA AGAGATAAAGT GCTCT AAGGGA T GCCA GTTTTT AA

EST      : GACTCGAGTGAAGAGGAAG GCG CAG GCTGAAAGTTTATGGATACAGAACAAACGTGGTGG AAGGTGARAT TACACT : 164
Nicotiana : GACTCGAGTGAAGAGGAAG GCG CAG GCTGAAAGTTTATGGATACAGAACAAACGTGGTGG AAGGTGARAT TACACT : 492
          GA TC AGTGAAGAGGAAG G CA GCTGA AA TT ATGGA TA CAGAACAACGTGGTGG AAGGTGAA TACA T

EST      : CATTTTGATGCGCTTCTGAGTTTGTATCA GCTGAG A GG GATGC TATGC ATGGAGCTTGCA T TC TTGG : 246
Nicotiana : CATTTTGATGCGCTTCTGAGTTTGTATCA GCTGAG A GG GATGC TATGC ATGGAGCTTGCA T TC TTGG : 574
          C ATTTTGATGCC T TCTGAGTTTGTATCA GCTGAG A GG GATGC TATGC ATGGAGCTTGCA T TC TTGG

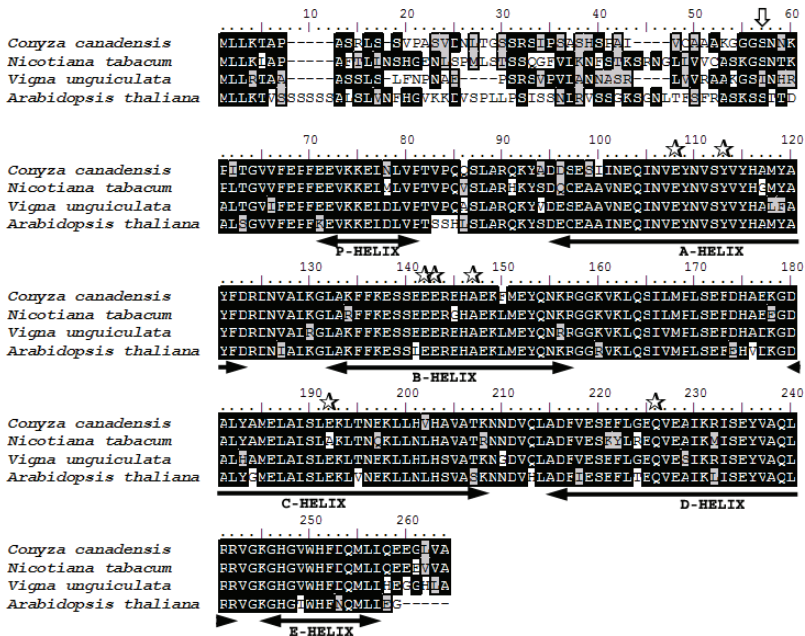
EST      : GAATTTGACAAATGAAACCTTGTAGATGTCAGGCGGTGCCACCAAGAACATGATGCAATTTGGCTGATTTTGTGAA : 328
Nicotiana : GAATTTGACAAATGAAACCTTGTAGATGTCAGGCGGTGCCACCAAGAACATGATGCAATTTGGCTGATTTTGTGAA : 656
          GAA TTGACAAAT A AA CTT TA A T CA GC GT GCCAC AACAAATGATGCA TTGGCTGATTTTGTGAA
    
```

23. ábra DDRT-PCR gélből izolált EST és a dohány ferritin molekulájának CLUSTALW analízise (Thompson et al, 1997). EST: általunk izolált és kromatogram alapján meghatározott szekvenciájú nukleotidszakasz, Nicotiana: dohány ferritin szekvencia (gi|22859013). A nukleotidszekvencia alapján a fekete részek teljes, a szürke részek részleges egyezést jelölnek. A gének alatti sorban a konszenzus szekvenciát tünteti fel a program.

A részszekvenciát követően mindkét biotípusból származó génszakaszt meghatároztuk teljes hosszában. A szentiv és a rezisztens növényekből nyert minták teljes szekvenciái között sem találtunk különbséget. A teljes hosszában meghatározott szekvenciát elhelyeztük a GenBank elsődleges nukleotid-szekvencia adatbázisban, az AJ786262 GI:50787936 hozzáférési szám alatt (3.sz. függelék).

Ezt követően a *Conyza* ferritin szekvenciáját *in silico* elemzéseknek vetettük alá. A *Conyza* ferritin szekvenciájának elemzése során azonosítottuk mind a prekursor plasztiszba juttatásához szükséges TP tranzit peptidet, mind az érett fehérje stabilitásáért felelős EP extenziós peptidet (Lobreaux et al, 1992) (24. ábra).





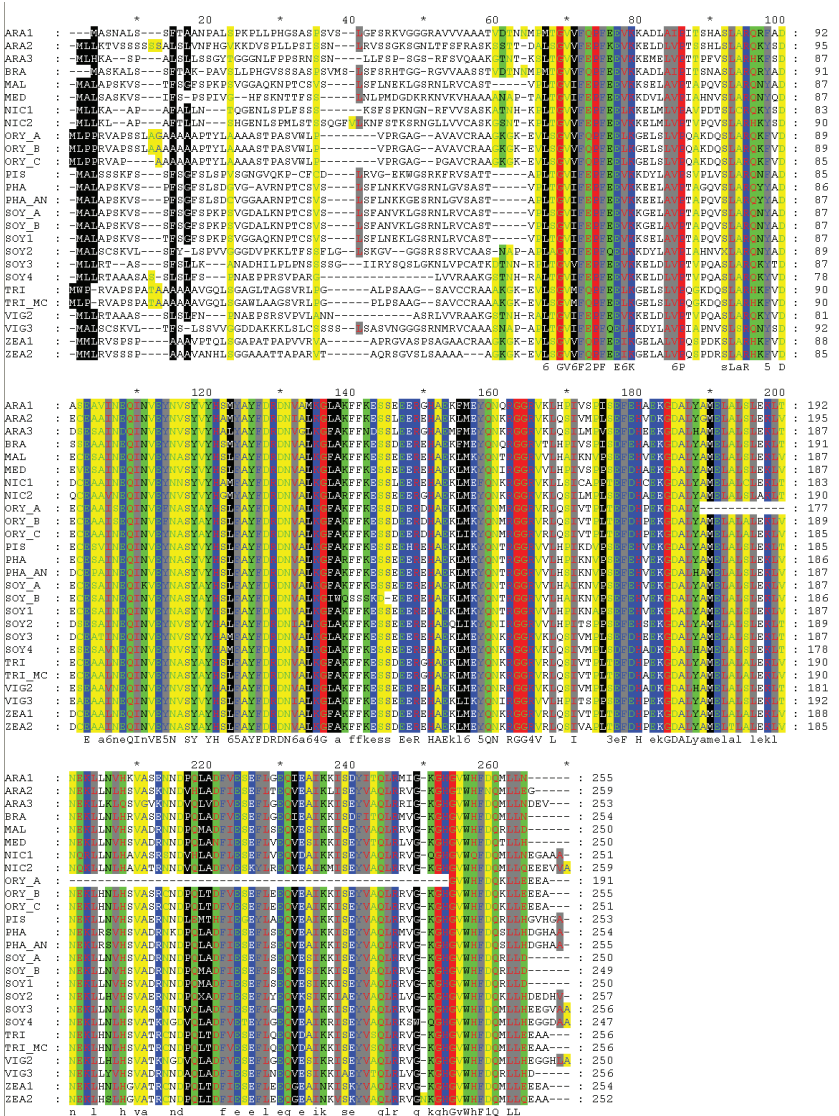
24. ábra *Conyza canadensis* (gi|50787936), *Arabidopsis thaliana* (gi|20148572), *Nicotiana tabacum* (gi|22859013), *Vigna unguiculata* (gi|2970653) ferritinek Thompson et al, 1997 szerinti CLUSTALW analízise. Az azonos aminosavak fekete, a nagymértékben hasonlók szürke kiemeléssel jelölve. A csillagok azokat az aminosavakat mutatják, melyek megfeleltethetők a humán H ferritinek ferredoxáz centrumának. A fehér nyíl a tranzitpeptid hasítási helyét jelöli.

A szekvenciát ezek után ismételtlen összevetettük az eddig ismert ferritinekkel (9. táblázat). Forrásként a cDNSről transzlált *Conyza canadensis* szekvenciája mellett a főbb, ismert növényi aminosav szekvenciákat vettük, melyet követően filogenetikai analízisnek vetettük alá a szekvenciákat.

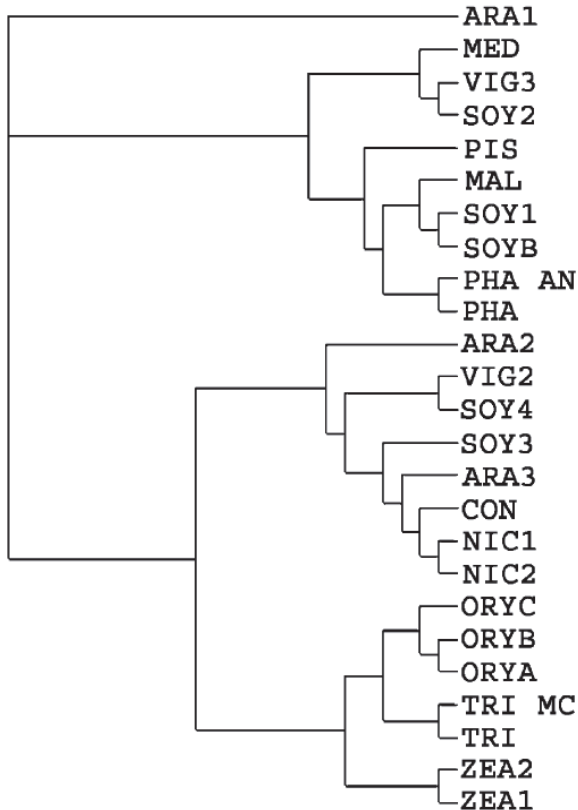
Az eredmények azt mutatták, hogy a *Conyza*-ból származó ferritin szekvencia leginkább a dohánynövény, az *Arabidopsis* ferritin3, illetve a szójabab ferritin3 molekuláival mutat filogenetikai rokonságot. (25. ábra és 26. ábra)

| Rövidítés | UniProt azonosító | Latin név                   |
|-----------|-------------------|-----------------------------|
| ARA1      | Q39101            | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ARA2      | Q9S756            | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ARA3      | Q9SRL5            | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| CON       | Q6A196            | <i>Conyza canadensis</i>    |
| MAL       | Q94FY2            | <i>Malus xiaojinensis</i>   |
| MED       | Q9ZP90            | <i>Medicago sativa</i>      |
| NIC1      | Q8RX97            | <i>Nicotiana tabacum</i>    |
| NIC2      | Q8H1T3            | <i>Nicotiana tabacum</i>    |
| ORY A,    | Q6VVA5            | <i>Oryza sativa</i>         |
| ORY B     | Q8L5K0            | <i>Oryza sativa</i>         |
| ORY C     | Q8LK80            | <i>Oryza sativa</i>         |
| PIS       | P19975            | <i>Pisum sativum</i>        |
| PHA       | P25699            | <i>Phaseolus vulgaris</i>   |
| PHA AN    | Q66N72            | <i>Phaseolus angularis</i>  |
| SOY 1     | P19976            | <i>Glycine max</i>          |
| SOY 2     | Q94IC4            | <i>Glycine max</i>          |
| SOY 3     | Q948P6            | <i>Glycine max</i>          |
| SOY 4     | Q948P5            | <i>Glycine max</i>          |
| SOY B     | Q941G7            | <i>Glycine max</i>          |
| TRI       | Q5G1L6            | <i>Triticum aestivum</i>    |
| TRI MC    | Q6DQK1            | <i>Triticum monococcum</i>  |
| VIG2      | Q41709            | <i>Vigna unguiculata</i>    |
| VIG3      | Q65100            | <i>Vigna unguiculata</i>    |
| ZEA1      | P29036            | <i>Zea mays</i>             |
| ZEA2      | P29390            | <i>Zea mays</i>             |

9. táblázat Ismert növényi ferritin gének



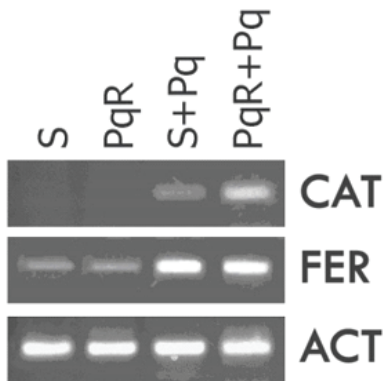
25. ábra Ismert ferritin fehérék CLUSTALW analízise (Thompson et al, 1997). Az egyezményes egykarakterből álló rövidítés szerinti aminosavak színekkel jelöltek, jellemzést lásd 15. ábra.



26. ábra Ferritinek molekuláris törzsfája. Az analízis során az alábbi fajok ferritinjeinek aminosavszekvenciáit vettük figyelembe: *Arabidopsis thaliana* ARA1, ARA2, ARA3 (Q39101, Q9S756 and Q9SRL5), *Conyza canadensis* CON (Q6A196), *Malus xiaojinensis* MAL (Q94FY2), *Medicago sativa* MED (Q9ZP90), *Nicotiana tabacum* NIC1 és NIC2 (Q8RX97, Q8H1T3), *Oryza sativa* ORY A, ORY B és ORY C (Q6VVA5, Q8L5K0, Q8LK80), *Pisum sativum* PIS (P19975), *Phaseolus vulgaris* PHA (P25699), *Phaseolus angularis* PHA AN (Q66N72), *Glycine max* SOY 1, SOY 2, SOY 3, SOY 4 és SOY B (P19976, Q94IC4, Q948P6, Q948P5, Q941G7), *Triticum aestivum* TRI (Q5G1L6), *Triticum monococcum* TRI MC (Q6DQK1), *Vigna unguiculata* VIG2 és VIG3 (Q41709, Q65100) és *Zea mays* ZEA1 és ZEA2 (P29036, P29390). A zárójelekben az Uniprot adatbázisból származó elsődleges hozzáférési számot (primary accession number) adtuk meg. A filogenetikai törzsfát a “neighbor-joining” módszerrel számolt evolúciós távolsági adatok alapján származtattuk (Saitou and Nei, 1987).

## A GÉNEXPRESSZIÓ VÁLTOZÁSOK MEGERŐSÍTÉSE SZEMIKVANTITATÍV RT-PCR TECHNIKÁVAL

A DDRT-PCR-ben kapott expressziós eredményeket szemikvantitatív RT-PCR vizsgálattal erősítettük meg. A kromatogramból származtatott szekvenciák alapján a kiemelten fontos EST-kre specifikus primereket terveztünk. A vizsgálatot mindkét biotípusban, natív és paraquat-kezelt mintán végeztük el. A PCR termékek mennyiségi összehasonlítása egy konstitutíven expresszálódó háztartási gén, az aktin (ACT) termékéhez viszonyítva történt. Az itt kapott eredmények összhangban álltak a DDRT-PCR foretogramjával (27. ábra).



27. ábra Szemikvantitatív RT-PCR eredménye. S: szenzitív, PqR: paraquat rezisztens, S+Pq: paraquat kezelt szenzitív, PqR+Pq paraquat kezelt rezisztens minta.

A FER gén expressziója mindkét biotípusban, egyaránt megnövekedett a paraquat-kezelésre. A CAT gén expressziója a kezelés hatására indukálódott, és szintjük a rezisztens biotípusban volt magasabb, miközben az aktin primerekkel készített minták végig állandó expressziós szintet mutattak.

## EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A betyárkóró (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.) az ismétlődő, tartós herbicidhasználat következményeként kialakult paraquat-rezisztens biotípusát a nyolcvanas években észlelték. Rezisztencia faktora az összes ismert rezisztens növényfaj közül a legmagasabb. Ellenállóképességének magyarázatára több elmélet született, de egyik sem bizonyult cáfolhatatlannak.

A korábbi kutatásainkból kiderült, hogy a paraquat a kloroplasztiszba, a hatáshelyére bejutva, fényindukált mechanizmus során mindkét biotípusban kifejti gátló hatását és funkcionális aktivitás csökkenést okoz, amit a rezisztens biotípus esetében 3-4 óra múlva helyreállítás követ (Lehoczki és Szigeti, 1988, Váradi et al 2000). A helyreállási folyamat fehérjeszintézis gátlóval (cikloheximid) megakadályozható, tehát a folyamathoz *de novo* fehérjeszintézis szükséges (Darkó et al, 1994). A rezisztencia mechanizmusban a aktív oxigén formákat elimináló rendszerek (SOD, APX, CAT) aktivitása nem növekedett meg. A szentitív és rezisztens biotípus egyaránt érzékenyen reagál szuperoxid-anion gyök generáló (menadion, bengálvörös) vegyületekkel történtő kezelésre. A paraquat nem metabolizálódik, a rezisztens növényekben a kezelést követően hónapok múlva is magas koncentrációban található meg az intracelluláris térben. Sejtfrakcionálási kísérleteink során a kezelt növények sejtfal, valamint citoplazmatikus és vakuoláris frakcióinak paraquat tartalmát megvizsgálva kiderült, hogy a herbicid feltehetően egyfajta szekvesztrációs mechanizmus segítségével metabolikusan inaktív kompartmentben, a vakuólumban halmozódik fel. A szekvesztrációban résztvevő, paraquat szanszportjára képes fehérjék feltárása választ adhat a *Conyza canadensis* (L.) Cronq. rendkívül magas herbicidrezisztenciájára.

Korábbi cikloheximides kezelések (Darkó et al, 1994) *de novo* fehérjeszintézisre engedtek következtetni, ezért a paraquatkezelés hatására indukálódó gének meghatározása megfelelő kiindulási alapot képezett a további kérdések megválaszolására. A paraquat számos más herbicidhez hasonló módon szuperoxid gyökök generálásával fejti ki hatását, azonban egyéb gátlós kísérleteink alapján kimutattuk, hogy a rezisztencia csak a paraquattal szemben áll fenn. Ezért az expressziós kísérletek során mindkét biotípus esetén az indukálódó gének közül a szuperoxid-stresszel összefüggő „expressziós háttérzajt” megszürendő, a kizárólag paraquat-indukáltakat úgy választottuk ki, hogy párhuzamosan a szuperoxidgyök generáló menadionnal is kezeltük a növényeket.

Az expressziós vizsgálatokat először differential-display PCR technikával végeztük el, majd eredményeinket szemikvantitatív PCR-rel is megerősítettük. A vizsgálatok során négy gén, egy myb-faktor, egy vakuoláris H+ATPáz, egy ferritin és egy kationos aminosavtranszporter homológ magasabb expresszióját mutattuk ki.

Ezek közül a ferritin mindkét biotípus esetén egyformán indukálódott, ezért az általános, paraquatkezelésre adott molekuláris válaszok megismerése érdekében a ferritin szerepét is tisztázni kívántuk. A leginkább a lipidmembránokat roncsoló reaktív hidroxil gyök termelődése szempontjából fontos a szabad Fe<sup>3+</sup> szint intracelluláris szabályozottsága. (Halliwell, 1993)

Ezt a feladatot legfőképpen a multimer vasraktározó fehérjék, a vasháztartás egyensúlyáért felelős ferritinek látják el (Dellagi et al, 2005). A 24 alegységből összeálló ferritinek minden sejtben megtalálhatóak, és akár 4500 vas atomot is képesek Fe(OH) formájában a molekula középső részén tárolni, így szabályozva a sejtben a szabad formában előforduló vas szintjét (Briet et al, 1999). A ferritin a vasat redukált formájában köti meg, és juttatja középső magjába, majd a sejt szükségleteinek megfelelően ferroxidáz aktivitása következtében képes annak oxidált formáját felszabadítani. (Balla et al, 1992)

Általános, védekezésben betöltött funkcióját sikerült közvetlenül is bizonyítani. Transzgenikus dohányban fokozott ferritin expresszió mellett azt tapasztalták, hogy a növény sokkal jobban képes ellenállni az oxidatív és a patogének által okozott stressznek, mint vad típusú társai. (Deák et al, 1999) A ferritin génnek differenciált expressziójával kapcsolatban több kutatást is végeztek. *Lupinus* esetében ABA és vas, *Arabidopsis*-ban pedig ABA, vas és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatását vizsgálták a ferritin expressziójára. *Arabidopsis*-ban ezen kívül a ferritin gén paraquat indukált expresszióját tapasztalták, míg ez a szint szinglet-oxigén jelenlétében az expressziós szint nem változott. (Camp op den et al, 2003).

A megfigyelést megerősítik a paraquat kezelt *Conyza*-n végzett expressziós vizsgálataink. Eredményeink azt mutatják, hogy a ferritinek mind a szenzitív, mind a rezisztens biotípusban, csak a paraquat kezelés hatására mutatnak megnövekedett expressziós értéket. Ez bizonyítékként szolgálhat, hogy a paraquat által okozott stresszre a növény átmeneti válaszként a ferritinek fokozott expressziójával válaszol, kivonva a rendszerből a Fenton-reakcióban résztvevő Fe<sup>3+</sup> ionokat.

Mivel a ferritin teljes szekvenciáját meghatároztuk, fontosnak tartottuk a ferritinek alapján a filogenetikai kapcsolatok tisztázását is, mellyel további gének kimutatásának tervezését segíthetjük elő. Azért is fontos kiemelni a *Conyza* ferritin génjének szekvenciáját, mivel az általunk kimutatott volt a legelső, teljes hosszában meghatározott, genomi adatbázisokban általunk közölt kódoló szakasz az eddig teljesen ismeretlen genomú *Conyza canadensis*-ből.

Ferritineket több fajból sikerült már izolálni, különálló, kisebb géncsaládok kódolják. Eddig az *Arabidopsis*-ban, lóbabban és szójababban négy külön ferritin gént azonosítottak a családon belül, míg hármat találtak a *Lupinus luteus*-ban, kettőt pedig a kukoricában és a *Vigna unguiculata*-ban (Petit et al, 2001, Connolly és Guerinot 2002).

A hasonlósági keresések alapján és a *Conyza* ferritin szekvenciájának elemzése során megtaláltuk mind a prekursor plasztiszba juttatásához szükséges TP tranzit peptidet, mind az érett fehérje stabilitásáért felelős EP extenziós peptidet (Lobreaux et al, 1992). Ezek a peptidek különböztetik meg a növényi és állati szervezetekben található ferritineket. A következtetett aminosav szekvencia alapján prediktált térszerkezeti elemzés kimutatta a ferritinek konzervált régióit, melyek a ferredoxáz aktivitásért és vas-nukleációért felelősek. (Lobreaux et al, 1992). A filogenetikai elemzést követően kiderült, hogy a *Conyza*-ból nyert, paraquat hatására megnövekedett expressziót mutató ferritin molekula leginkább a dohány ferritin2, az *Arabidopsis* ferritin3, illetve a szójabab ferritin3 molekulákkal áll a filogenetikai rokonságban.

A másik kulcsfontosságú, a rezisztens biotípusban paraquatkezelésre jóval magasabb szinten indukálódó EST egy, a CAT4 *Arabidopsis thaliana* kationos aminosavtranszporterrel nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciareészlet volt. A CAT4 az *Arabidopsis* aminosav-poliamin-kolin transzporter APC fehérjék családjába tartozik, a CAT kationos aminosavtranszporterek alcsaládjába. Az CAT transzporterek tág szubsztrátspecifitást mutatnak: többféle, egymástól eltérő karakterű aminosav és egyéb molekulák transzportját is elvégzik. A család tagjai közül többnek feltárták pontos működését és lokalizáltságát. (Su et al, 2004, Frommer et al, 1995)

Expressziós vizsgálataink során a tonoplaszton lokalizált CAT4-hez hasonló fehérjét kódoló gént azonosítottunk. Valószínűsíthető, hogy egy, a vakuoláris membránon lokalizált antiporter felel a kationos aminosavak, poliaminok és töltéseloszlásukban illetve méretükben hasonló egyéb molekulák transzportjáért, így adott esetben kompetíció



alakulhat ki a poliaminok valamint a méretében és kationos töltésében hasonlóságot mutató bipiridil, a paraquat között (Mornet et al., 1997).

Feltevésünket alátámasztják az *in silico* elemzések, melyek során a putreszcinnal és a paraquat kötőhelyeket határoztuk meg (2. sz. függelék). A kationos aminosavtranszporterek kivételével forrásként szolgált három további gén: a paraquat transzportjára képes 12-TMS másodlagos multitidrogreiszstens fehérjecsaldába tartozó, *Ochrobactrum anthropi* transzporter PqrA (Jo et al., 2004), a fokozott mértékű expresszálsága esetén paraquatrezisztenciához vezető, élesztőből származó poliamintranszporter TPO, valamint a TPO őse, a prokarióta homológ poliamintranszporter PotE (Tomitori et al., 1999, Uemura et al., 2005). A PqrA és a TPO bizonyítottan szubsztrátjaként használja a paraquatot, illetve expresszálságuk szintje összefügg a paraquat-rezisztenciával (2. sz. függelék).

A paraquatot is szubsztrátként használó, *Saccharomyces* poliamintranszporter TPO és prokarióta homológjának, a PotE-nek szerkezeti elemzése során feltárták, hogy a putreszcinnal és így a paraquatkötés szempontjából is a legfontosabb pozíciók az N terminális felől haladva a II, a VI. és a XII. transzmembrán domént követő, citoplazmatikus régióban elhelyezkedő glutaminsavak. A kationos aminosavtranszporter CAT család tagjai közül kizárólag a CAT4 teljesítette a feltételeket, valamint hasonlósági keresések alapján is ez az a növényi antipporter, mely a leginkább hasonlít primer szerkezetében is az élesztő illetve *E. coli* putreszcinnal transzporteréhez. A transzmembrán domének és glutaminsavak hasonló konfigurációjú elhelyezkedése lehetővé teszi azt a specifikus töltéseloszlással és kötési távolságokkal bíró térszerkezetet, melybe a putreszcinnal, illetve adott esetben a hasonló méretű és hasonló töltéssel rendelkező paraquat képes kötni (2.sz. függelék).

Az *Ochrobactrum anthropi* PqrA génjének *in silico* elemzése is érdemi tanulságokkal szolgált. A gén szerkezeti elemzése számunkra kiemelkedően fontos volt, mivel talajlakó baktérium membrántranszportert kódoló PqrA génjével létrehozott transzgenikus dohány esetében a *Conyza*-hoz hasonló mértékű paraquat-rezisztenciát figyeltek meg. A dohánynövény így ellenállt a magas dózisú paraquatkezelésnek, azonban más, reaktív oxigén gyököket generáló ágensekre nem bizonyult rezisztensnek. A gén tehát, amelynek terméke egy membránban lokalizált transzporterfehérje, egyedül felelős a transzgenikus növény nagyfokú paraquat rezisztenciájáért (Jo et al., 2004).

Ennél a génnél, az *in silico* elemzések során megfigyelhető az előbbi poliamin transzporterekhez képest kismértékben eltérő szerveződés. A citoplazma felé néző régiói között is csupán háromnál találunk glutaminsavat, viszont itt egy régióon belül akár többet is. Ezzel paralell a CAT4 transzporternél is több glutaminsav helyezkedik el a VI és a XII. transzmembrán domént követő régióban. Vélhetőleg a kationok számára energetikailag sokkal kedvezőbb, kapcsolódást megkönnyítő, negatív töltésű környezet létrehozásában fontosak.

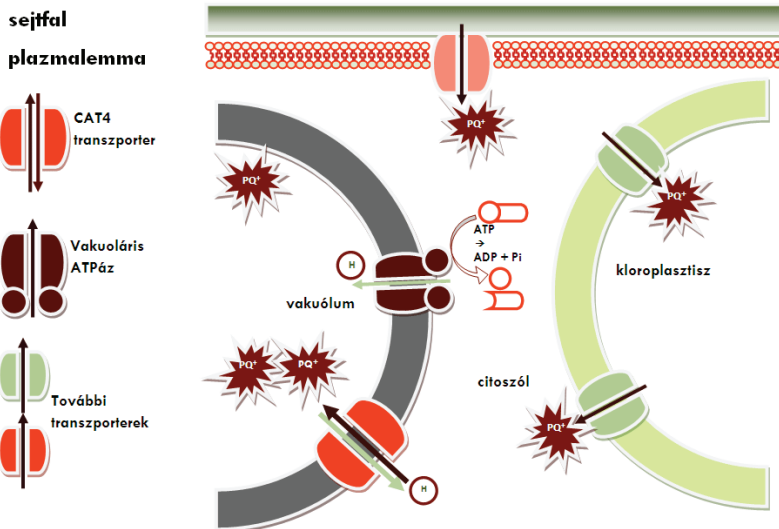
Az *in silico* elemzések alapján elmondhatjuk, hogy a CAT4 antiporter hasonlít leginkább primer szerkezetében a prokarióta putreszcintranszporter PotE-re, melynek homológja az élesztőben képes a paraquatot szubsztrátként elfogadni. A putreszcinkötőhelyek meghatározásával megállapítottuk, hogy a CAT4 kationos aminosavtranszporter transzmembrán doménjei és glutaminsavban rendkívül gazdag régióinak PqrA paraquatrezisztencia fehérjével egybevágó topográfiája alkalmassá teszi a putreszcin, illetve egyéb kationos molekulák – így a bipiridil paraquat – vakuoláris membránon keresztüli transzportjára. Ez a tény megerősíti azt a jelen kísérletekkel közvetve alátámasztott feltételezésünket, hogy akár egyetlen transzporter megváltozása vagy fokozott expressziója felelőssé tehető jelentős mértékű rezisztencia kialakulásáért.

A CAT4 génjének repceből történő kimutatása is fontos eredménynek számít a későbbi kísérletek és a CAT gének filogenetikai kapcsolatainak feltárása szempontjából. A genomiális DNS-ből származó nukleotidszekvenciánál rendkívül nagy, összességében 93%-os hasonlóságot tapasztaltunk. A reverz transzkripcióval nyert EST szekvenciát *in silico* transzlálva a repce és az *Arabidopsis* CAT fehérje részlet elsődleges szerkezetében megegyezett.

Mindent összevetve a paraquat felvételi kinetikája és sejten belüli kompartmentalizációja alapján azt állíthatjuk, hogy a paraquat szekvesztrálódik a rezisztens *Conyza canadensis* (L.) Cronq. növényekben. A hatáskifejtés kezdeti stádiumában általános válaszreakcióként indukálódó, a reaktív oxigéngyökök által okozott akut károsodásokat csökkentő ferritin után a szekvesztrációban központi szerepet tölthet be a CAT4 kationos aminosavtranszporter.

A rezisztens biotípus CAT4 génje vélhetőleg nagyobb affinitást mutat a paraquattal szemben, köszönhetően vélhetőleg a fehérje transzmembrán szakaszán elhelyezkedő módosult, glutaminsavban gazdag putreszcinkötőhelyeinek. Az is lehetséges, hogy a

rezisztens biotípus tonoplasztjában több transzporter helyezkedik el. A szekvesztrációs hipotézist korábbi frakcionálási méréseink is alátámasztják, amikor a kloroplasztisz paraquatszintje lecsökkent, azonban a vakuoláris-citoplazmatikus frakció paraquatszintje megnövekedett (Jóri et al, 2007). A vakuoláris szekvesztrációt alátámasztják a gátlós kísérleteink, ahol a CAT4 vakuoláris lumen felé történő paraquat transzportjának elektrokémiai gradiens igényét biztosító, molekuláris vakuoláris  $H^+$ -ATP-ázokat blokkoltuk. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *Conyza* CAT4 gén alkalmas lehet a paraquat intracelluláris transzportjára és szekvesztrációjára (28. ábra).



28. ábra A paraquat rezisztenciát okozó, vakuoláris szekvesztráció valószínűsített folyamata. A paraquat a plazmalemmán át egy ismeretlen transzporter közvetítésével jut be a sejtbe. Az intracelluláris térből további transzporterek révén a kloroplasztisz sztrómájába kerül, majd újra a citoszólba transzlokálódik. A vakuólumba a CAT4-gyel homológ, kationos aminosavtranszporter juttatja a paraquatot. Az antiporter energiaigényét egy vakuoláris  $H^+$ -ATP-áz fedezi, melyet a  $NO_3^-$  kezeléssel tudunk blokkolni. Valószínűsíthető, hogy a rezisztens biotípusú *Conyza*-ban a CAT4 homológ transzporter nagyobb affinitással képes a paraquatot szubsztrátjaként kezelni, mint a szenzitívben, illetve fokozott expressziója révén több transzporter épül be a vakuoláris membránba, így hatékonyabban képes a paraquatot a vakuólum irányába szekvesztrálni.

Mivel jelenleg a gének csupán parciális szekvenciája ismert, elkerülhetetlennek tűnik a teljes gén meghatározása a jövőben. Erre kiválóan alkalmasak a közelmúltban kifejlesztett, teljes genomi analízist elvégző, új generációs genomszekvenátorok, melyek több millió bázist képesek akár egyetlen nap leforgása alatt meghatározni. Így a nemrég még több évnyi, kutatócsoportok összehangolt és megfeszített munkáját igénylő teljes genomanalízis bárki számára hozzáférhetővé vált. A *Conyza* genomjának esetében a CAT4 parciális szekvenciájának ismerete jelentős mértékben megkönnyíti a gént körülvevő genomiális környezet meghatározását. A CAT4 teljes szekvenciájának birtokában pedig beazonosíthatók azok a térszerkezetbeli különbségek, esetleges kötőhelyben történt mutációk, melyek a paraquat iránt mutatott nagyobb affinitásért illetve gyorsabb transzportjáért és ezen keresztül a rezisztenciáért felelnek. Emellett az expressziós különbségeket is könnyebb lesz vizsgálni a teljes szekvencia birtokában. A genom akár részleges ismeretében is lehet olyan expressziós paneleket tervezni, melyek több gén episztázisát, expressziós mintázatát figyelik. Lehetőség nyílik olyan real-time esszék tervezésére is, melyek több gén pontos kópiaszámát illetve expressziós szintjét is képesek pontosan meghatározni. Ezek után meghatározhatjuk az összes olyan gént és anyagcsere-útvonalat is, mely a rezisztenciában részt vesz. A kulcsfontosságú gének szerepét RNS interferencia módszerekkel illetve transzgénikus knock-out növények létrehozásával bizonyíthatjuk.

Az intracelluláris transzportfolyamatok szekvesztrációban betöltött szerepét nemcsak a *Conyza*, de más, herbiciddel szemben ellenálló növényfajok esetén is érdemes lenne megvizsgálni. Így a szekvesztráción alapuló herbicidrezisztencia molekuláris hátterének feltárásával lehetőség nyílna transzgénikus növények létrehozására, de akár teljesen újszerű, az antibiotikum-rezisztenciát kikerülő, a paraquat rezisztenciájáért felelős gént szelekciós markerként felhasználó transzformációs módszer kidolgozására is.

# FÜGGELEK

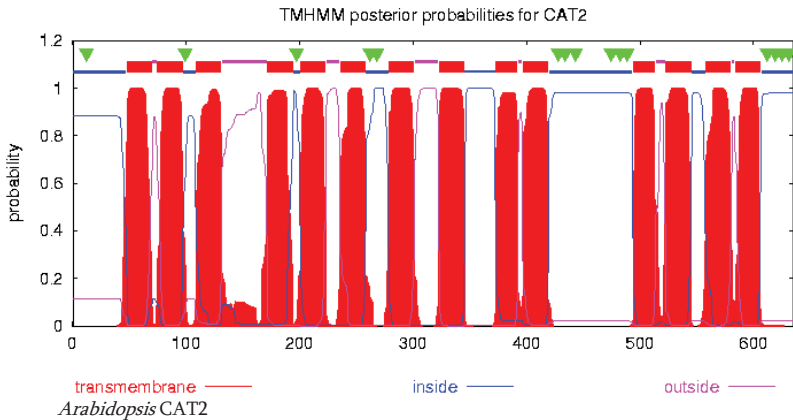
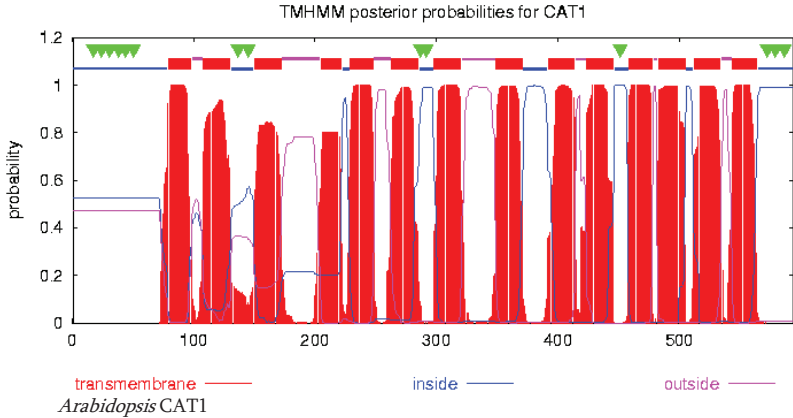
## 1. SZÁMÚ FÜGGELEK: ADATBÁZIS AZONOSÍTÓK LISTÁJA

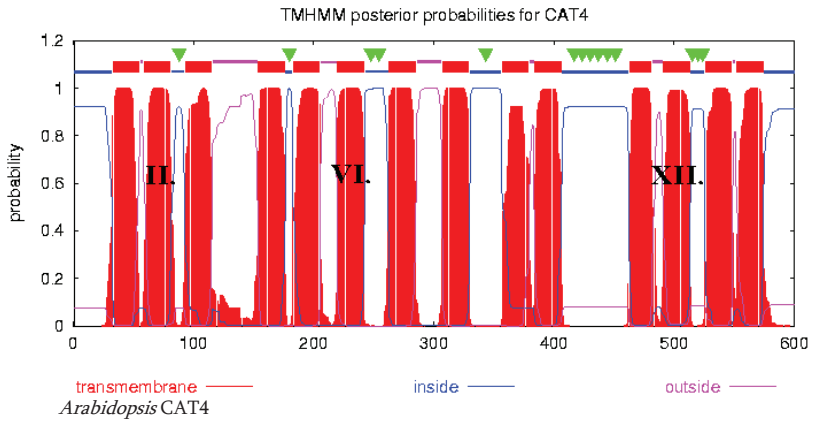
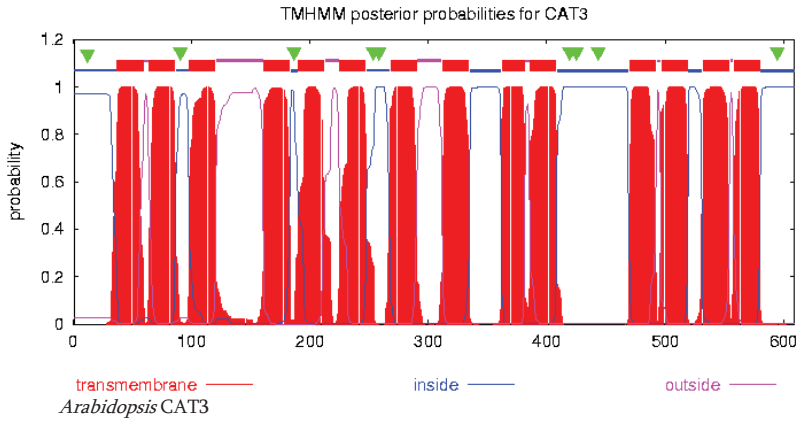
| NCBI azonosító | Uniprot | NCBI<br>Gene ID | rövid        | faj                             | leírás                            |
|----------------|---------|-----------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| gi:186518351   | Q84MA5  | 827860          | CAT1         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 1 |
| gi:186497660   | Q9ASS7  | 842170          | CAT2         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 2 |
| gi:186532933   | Q8GYB4  | 833664          | CAT3         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 3 |
| gi:186511376   | Q8W4K3  | 821176          | CAT4         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 4 |
| gi:186509467   | O64759  | 818060          | CAT5         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 5 |
| gi:186532933   | Q9LZ20  | 830355          | CAT6         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 6 |
| gi:186511376   | Q9SQZ0  | 820229          | CAT7         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 7 |
| gi:186497660   | Q9SHH0  | 838282          | CAT8         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter 8 |
| gi:186497660   | Q9C5D6  | 837104          | CAT9         | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | cationic amino acid transporter9  |
| gi:186532933   | Q39101  | 831720          | ATFER1       | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | ferritin 1, ferric iron binding   |
| gi:186509467   | Q9S756  | 818622          | ATFER4       | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | ferritin 4, ferric iron binding   |
| gi:186511376   | Q9SRL5  | 820276          | ATFER2       | <i>Arabidopsis thaliana</i>     | ferritin 2, ferric iron binding   |
| gi:75289753    | Q6A196  | *               | CONCD        | <i>Coryza canadensis</i>        | ferritin                          |
| gi :29839253   | Q94FY2  | *               | APF1         | <i>Malus xiaojinensis</i>       | ferritin                          |
| gi:75315621    | Q9ZP90  | *               | MEDSA        | <i>Medicago sativa</i>          | ferritin                          |
| gi :29839371   | Q8RX97  | *               | NtFer1       | <i>Nicotiana tabacum</i>        | ferritin 1                        |
| gi:29839345    | Q8HIT3  | *               | NtFer2       | <i>Nicotiana tabacum</i>        | ferritin 2                        |
| gi:75292791    | Q6VVA5  | *               | Q6VVA5       | <i>Oryza sativa</i>             | ferritin                          |
| gi:115489835   | Q8L5K0  | 4351264         | Q8L5K0       | <i>Oryza sativa</i>             | ferritin 1                        |
| gi :75301478   | Q8LK80  | *               | Q8LK80       | <i>Oryza sativa</i>             | ferritin                          |
| gi: 417006     | P19975  | *               | FRI_PEA      | <i>Pisum sativum</i>            | ferritin-1                        |
| gi :120531     | P25699  | *               | FRI_PHAVU    | <i>Phaseolus vulgaris</i>       | chloroplast ferritin              |
| gi:75288881    | Q66N72  | *               | Q66N72_PHAAN | <i>Phaseolus angularis</i>      | chloroplast ferritin              |
| gi:120532      | P19976  | 547824          | FRI1_SOYBN   | <i>Glycine max</i>              | ferritin light chain              |
| gi:29839388    | Q941C4  | 547988          | FRI2_SOYBN   | <i>Glycine max</i>              | SferH-2 ferritin                  |
| gi :29839387   | Q948P6  | 547476          | FRI3_SOYBN   | <i>Glycine max</i>              | SferH-3 ferritin                  |
| gi :29839386   | Q948P5  | 547477          | FRI4_SOYBN   | <i>Glycine max</i>              | SferH-4 ferritin                  |
| gi:75305965    | Q941G7  | *               | Q941G7_SOYBN | <i>Glycine max</i>              | ferritin                          |
| gi :75284501   | Q5G1L6  | *               | Q5G1L6_WHEAT | <i>Triticum aestivum</i>        | ferritin                          |
| gi :75289899   | Q6DQK1  | *               | Q6DQK1_TRIMO | <i>Triticum monococcum</i>      | ferritin                          |
| gi: 29839287   | Q41709  | *               | FRI2_VIGUN   | <i>Vigna unguiculata</i>        | ferritin-2, chloroplastic         |
| gi:29840836    | P29036  | 542553          | FRI1_MAIZE   | <i>Zea mays</i>                 | ferritin1                         |
| gi :29840837   | P29390  | 542392          | FRI2_MAIZE   | <i>Zea mays</i>                 | Ferritin-2, chloroplastic         |
| gi:49175990    | POAAF1  | 945422          | POTE_ECOLI   | <i>Escheridia coli</i>          | putrescine transport protein      |
| gi :85666119   | Q07824  | 850631          | TP01_YEAST   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Polyamine transporter 1           |
| gi:9438231     | *       | *               | PqrA         | <i>Ochrobactrum anthropi</i>    | paraquat resistance protein PqrA  |

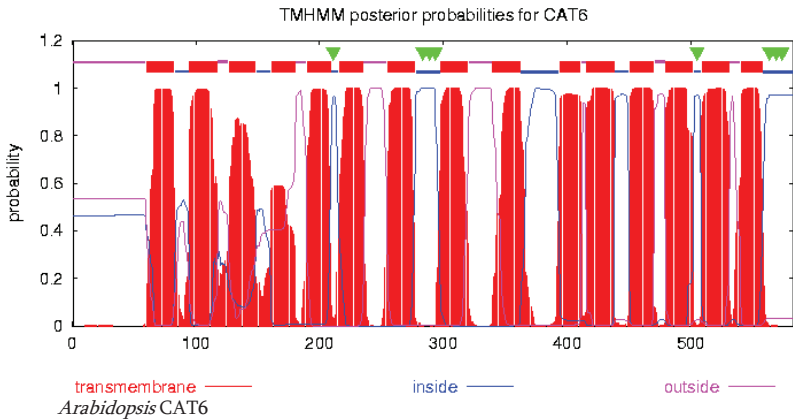
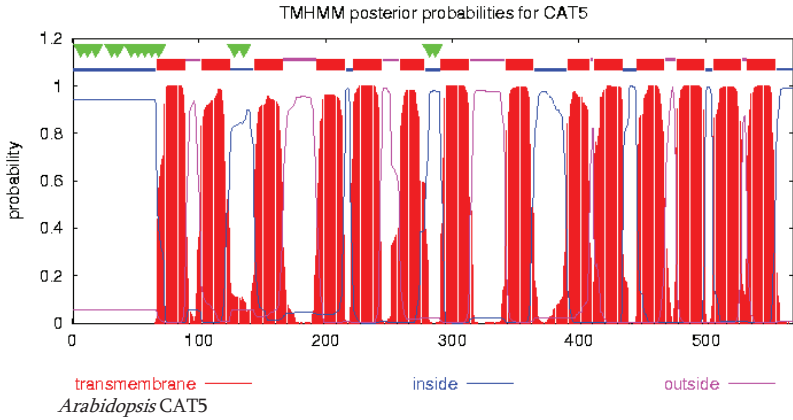
\* Az adatbázis felé nincs annotálva.

## 2. SZÁMÚ FÜGGELÉK: TRANZMEMBRÁN DOMÉNEK ÉS PUTRESCINKÖTŐHELYEK *IN SILICO* ELŐREJELZÉSE

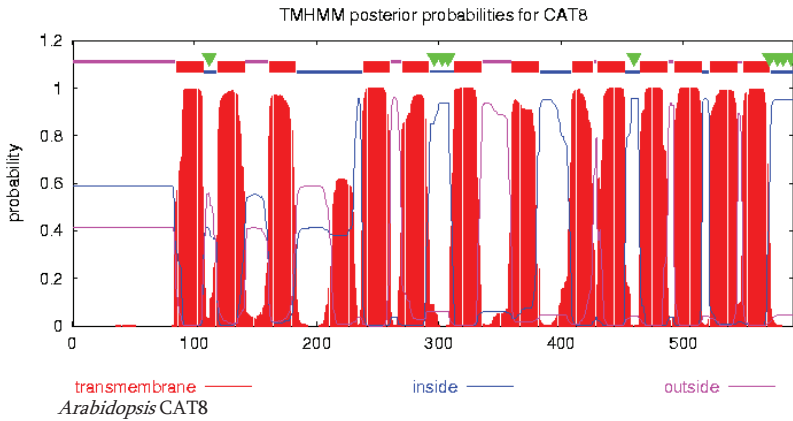
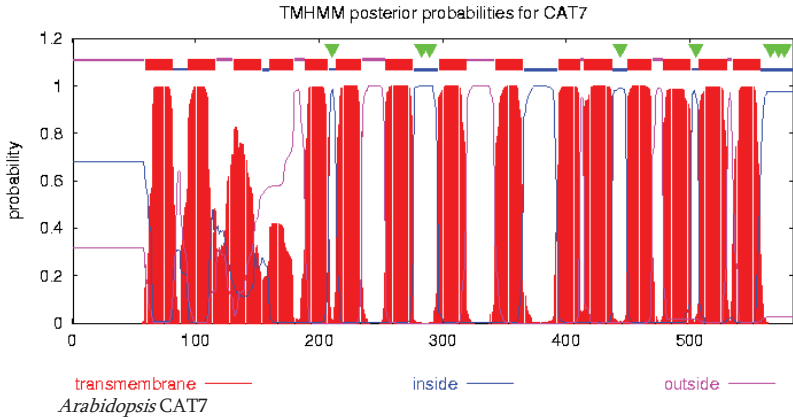
Az ábrákon az elsődleges szerkeztből előrejelzett transzmembrán doméneket a piros, a citoplazma felé eső aminosavszekvencia részeket a kék, míg a külső tér felé néző régiókat a lila szín jelöli. A belső tér felé néző régiókban található glutaminsavakat zöld nyilak jelölik.

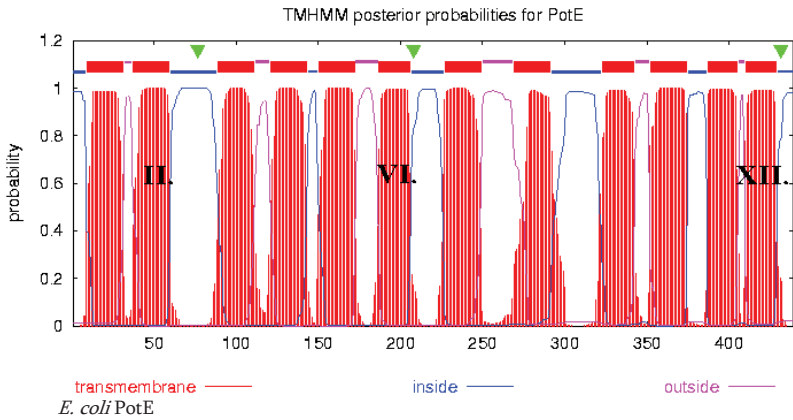
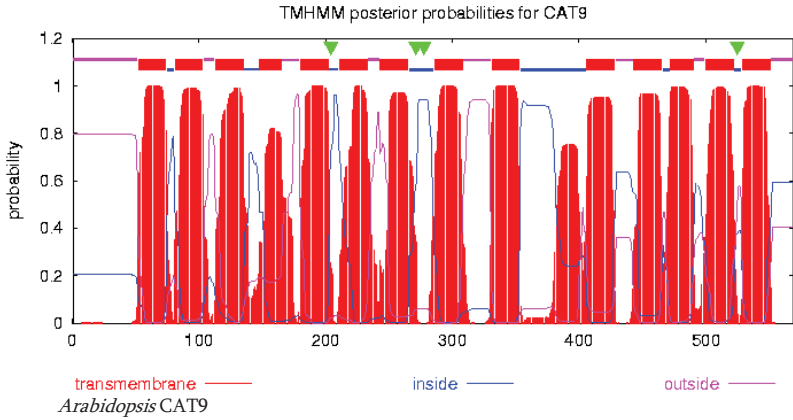


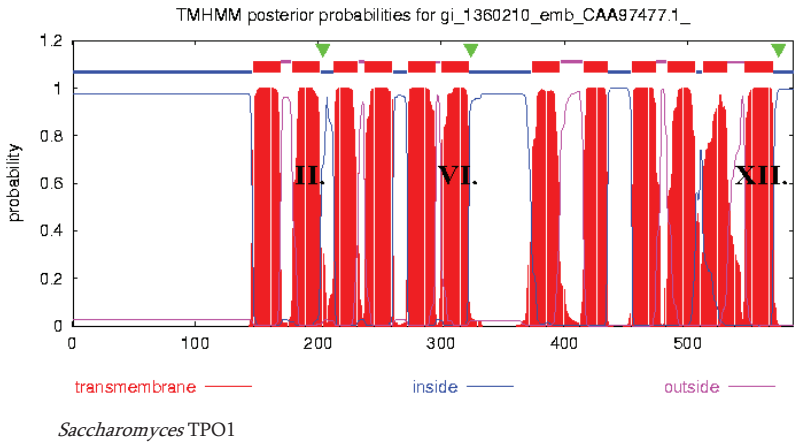
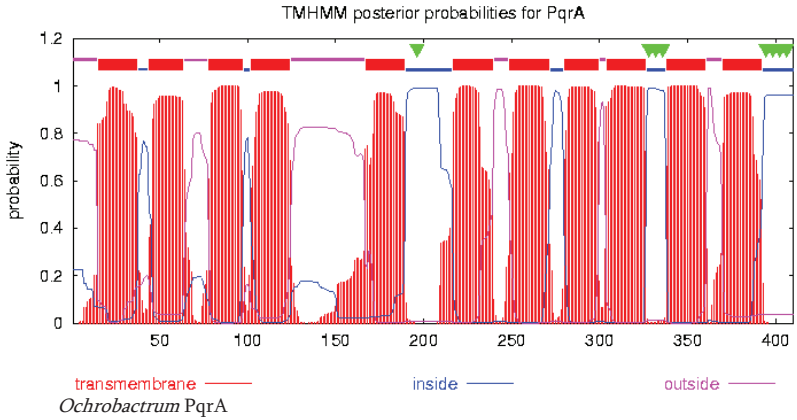












### 3.SZÁMÚ FÜGGELEK: FERRITIN SZEKVENCIA

LOCUS AJ786262 765 bp mRNA linear PLN 28-JUL-2004  
 DEFINITION *Conyza canadensis* mRNA for ferritin (fer gene).  
 ACCESSION AJ786262  
 VERSION AJ786262.1 GI:50787936  
 KEYWORDS fer gene; ferritin.  
 SOURCE *Conyza canadensis*  
 ORGANISM *Conyza canadensis*  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;  
 asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;  
 Astereae; *Conyza*.

REFERENCE 1  
 AUTHORS Jori,B. and Soos,V.  
 TITLE Ferritin sequence from horseweed (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.)  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 765)  
 AUTHORS Jori,B.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (27-JUL-2004) Jori B., Department of Plant Physiology,  
 Eotvos Lorand University, Budapest, Pazmany Peter setany 1/c.,  
 H-1117, HUNGARY

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..765  
 /organism="Conyza canadensis"  
 /mol\_type="mRNA"  
 /db\_xref="taxon:72917"  
 /tissue\_type="leaf"  
 /country="Hungary"  
 gene 1..765  
 /gene="fer"  
 CDS 1..765  
 /gene="fer"  
 /codon\_start=1  
 /product="ferritin"  
 /protein\_id="CAH05075.1"  
 /db\_xref="GI:50787937"  
 /translation="MLLKTAFASRLSSVPSVDNLTGSSRSIPSASHSPAIVCAAAGK  
 GGSNNKPIITGVVFEEFEEVKELNLVPTVPQQSLARQKYADDSSEIINEQINVEYVNS  
 VYVHAMAYFDRDNVALKGLAKFFKESSEEREHAEFMEYQNKRGKVKIQLSILMPL  
 SEFDHAEKGDALYAMELALSLEKLTNEKLLHVHAVATKNNNDVQLADFVSEFLGEQVE  
 AIKRISEYVAQLRRVKGKHGWHFDQMLLQEEGLVA"

ORIGIN  
 1 atgcttctca aaacagctcc tgcttctcgg ctatcttctg tcccggcacc ggtagataat  
 61 ctcaaccggat cttcgcgctc aattccgctc gcttcaacatt ccccggcgat cgtttgtggg  
 121 gcagcgaaaag cgcgcgcgctc aaacaacaaa ccgataactg gtgttgtggt tgaaccgttt  
 181 gaagaagtga aaaagagctc taatctgtgt cctactgttc ctaacaactc tcttgcctgt  
 241 cagaataacg ctgatgatc tgaatccatc atcaatgaac agatcaatgt tgagtacaat  
 301 gtttcatatg tgaaccatgc tatgtatgct tactttgata gagataatgt agctccaag  
 361 ggattagcca agttttttta gggactctag gaagaggaaa gggaacatgc tgaaaaagttt  
 421 atggaatacc agaacaaaag tgytggttaag gtgaaattac aatctatttt gatgcccttg  
 481 tctgagtttg atcacgctga gaaaggggat gcactttatg ctatggagct tgcattgtca  
 541 ttggagaaat tgacaaatga gaaacttcta catgtccatg ccggtggccac caagaacaat  
 601 gatgtgcaat tggctgatgt tgytgaagc gagttcttgg gtgaacagyt tgaggcaact  
 661 aagagaatct ctgaatatgt ggctcagctg agaagagttg gcaaaaggaca tgytgtttg  
 721 cactttgatc agatgctctt gcaagaggaa gggctttag catga//

# IRODALOMJEGYZÉK

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990): "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Aouida et al (2005): AGP2 Encodes the Major Permease for High Affinity Polyamine Import in *Saccharomyces cerevisiae* J Biol Chem. 280:24267-76.
- Babbs C. F., Pham J. A., Coolbaugh R. C. (1989): Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. Plant Physiol 90: 1267-1270
- Bagni N, Torrigiani P (1992): Polyamines: a new class of growth substances. In CM Karssen, LC Van Loon, D Vreugdenhil, eds, Progress in Plant Growth Regulation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 264-275
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W. and Vercellotti, G.M. (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. J. Biol. Chem. 267:18148–18153
- Bowyer J. R., Camilleri P. (1985): Spin-trap study of the reactions of ferredoxin with reduced oxygen species in pea chloroplasts. Biochim Biophys Acta 808: 235–241.
- Briat, J.-F., Lobreaux, S., Grignon, N. and Vansuyt, G. (1999): Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. Cell. Mol. Life Sci. 56:155–166
- Brooke-Taylor S, Smith LL, Cohen GM. (1983): The accumulation of polyamines and paraquat by human peripheral lung. Biochem Pharmacol. 32:717-20.
- Bush DR (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 29: 513–542
- Camp op den RG, Przybyla D, Ochsnein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, Nater M, Apel K. (2003): Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*, Plant Cell. 10:2320-32.
- Carr RJG, Bilton RF, Atkinson T (1985): Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. Appl. Environ.Microbiol.,49: 1290-1294
- Chen N, Bowles MR, Pond SM. (1992): Competition between paraquat and putrescine for uptake by suspensions of rat alveolar type II cells. Biochem Pharmacol. 44:1029-36.
- Cheung AY, Bogorad L., Montagu M. V., Schell J. (1988): Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene. Proc Nat Acad Sci USA 85: 391-395.
- Chun JC, Kim JC, Hwang IT, Kim SE (2002): Acteoside from *Rehmannia glutinosa* nullifies paraquat activity in *Cucumis sativus*. Pestic Biochem Physiol 72: 153-159.
- Chun JC, Ma SJ, Kim SE, Lee HJ (1997): Physiological responses of *Rehmannia glutinosa* to paraquat and its tolerance mechanisms. Pestic Biochem Physiol 59: 51–63.
- Connolly EL, Guerinet M (2002): Iron stress in plants. Genome Biol. 3:1024.
- Cronquist A (1976): *Conyza*. In: Flora Europea, Vol.4. (Tutin TG, Hewood VH, Burges NA, Moore DM, Valentin DH, Walters SM and Webb DA eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, NY, p120
- Darkó É, Lehoczki E, Szigeti Z (1994): Nuclear coded protein can be involved in the mechanism of paraquat resistance. Biol Plantarum Suppl. 36: S342.

- Deak, M., Horvath, G.V., Davletova, S., Torok, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Kiraly, Z. and Dudits, D. (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat. Biotechnol.* 17, 192–196
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat JF, Gaymard F, Expert D. (2005): Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* 43:262-72.
- DiTomaso JM, Hart JJ, Kochian LV. (1993) Compartmentation Analysis of Paraquat Fluxes in Maize Roots as a Means of Estimating the Rate of Vacuolar Accumulation and Translocation to Shoots. *Plant Physiol.* 102:467-472.
- Doige CA, Ames GFL (1993): ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 47: 291-319.
- Frommer WB, Hummel S, Unsel M, Ninnemann O. (1995): Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:12036-40.
- Fuerst EP, Nakatani HY, Dodge AD, Penner D, Arntzen CJ. (1985): Paraquat Resistance in *Conyza*. *Plant Physiol.* 77:984-989.
- Fujii T, Yokoyama E, Inoue K, Sakurai H (1990): The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen. *Biochim Biophys Acta* 1015: 41-48
- Funderburk HH Jr., Bozarth GA (1967): Review of the metabolism and decomposition of diquat and paraquat. *J. Agric. Food Chem.*, 15:563-567.
- Gaudreault P, Karl PI, Friedman PA (1984) Paraquat and putrescine uptake by lung slices of fetal and newborn rats. *Drug Metab Dispos* 12: 550-552
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey RW, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hocheisel JF, Jacq C, Johnston M (1996) Life with 6000 genes *Science*, 274:546-567
- Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mordant P, Saier Jr MH (1997): Multidrug-resistant transport proteins in yeast, complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* 13:43-54
- Gottesmann MM, Pastan I(1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug resistance transporter *Annual Review of Biochemistry* 62, 385-427.
- Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE (1986): Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature.* 323:728-31.
- Halász K, Soós V, Jóri B, Rác I, Lásztity D, Szigeti Z (2002): Effect of transporter inhibitors on paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* L./ Cronq.). *Acta Biologica Szegediensis*, 46:23-24
- Halliwell, B. ( 1993) The chemistry of free radicals. *Toxicol. Ind. Health*, 9, 1–21.
- Hart JJ, DiTomaso JM, Linscott DL, Kochian LV. (1992) Transport Interactions between Paraquat and Polyamines in Roots of Intact Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 99:1400-1405.
- Harvey BMR, Fraser TW (1980): Paraquat tolerant and susceptible perennial ryegrasses: effects of paraquat treatment on carbon dioxide uptake and ultrastructure of photosynthetic cells. *Plant Cell Environ* 3: 107-117.
- Harvey BMR, Harper DB (1982): Tolerance to bipyridilium herbicides. In LeBaron HM, Gressel J, eds, *Herbicide Resistance in Plants*. John Wiley and Sons, New York, pp 215-233
- Hashimoto Y, Soderling TR (1989): Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C *The Journal of Biological Chemistry*, 264:16524-16529

- Hasne , Ullman (2005): Identification and Characterization of a Polyamine Permease from the Protozoan Parasite *Leishmania major* J Biol Chem. 280:15188-94.
- Hingamp P, van den Broek AE, Stoesser G, Baker W (1999): The EMBL Nucleotide Sequence Database. Contributing and accessing data Mol Biotechnol. 12:255-67.
- Hiyama T., Ohinata A., Kobayashi S. (1993): Paraquat (methylviologen): its interference with primary photochemical reactions. Z. Naturforsch. 48C, 374-378
- Hongo, E., Morimyo, M., Mita, K., Machida, I., Hama-Inaba, H., Tsuji, H., Ichimura, S., and Noda, Y. (1994) The methyl viologen-resistance-encoding gene smvA of *Salmonella typhimurium*. Gene 148, 173-174.
- Horánszky A., Járainé KM (1990): Növényrendszertani praktikum, Tankönyvkiadó, 462.o.
- Hunyadi K, Almádi L (1981): Szántóföldi gombafajok csíranövényei és herbicidérzékenyséjük, Mezőgazdasági Kiadó, p. 142-144.
- Igarashi K, Kashiwagi K (1999): Polyamine transport in bacteria and yeast, The Biochemical Journal, 344:633-642
- Jo J, Won SH, Son D, Lee BH (2004): Paraquat resistance of transgenic tobacco plants over-expressing the *Ochrobactrum anthropi* pqrA gene Biotechnol Lett. 18:1391-6.
- Jóri B, Soós V, Szegő D, Páldi E, Szigeti Z, Rácz I, Lásztity D (2007): Role of transporters in paraquat resistance of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Pesticide Biochemistry and Physiology 88: 57-65
- Kakinuma Y, Maruyama T, Nozaki T, Wada Y, Ohsumi Y, Igarashi K. (1995): Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun. 216:985-92.
- Kaouass M, Audette M, Ramotar D, Torossian K, Gamache I, DeMontigny D, Verma S, Poulin R (1997): Molecular and Cellular Biology, 17:2994-3004
- Kashiwagi K, Shibuya S, Tomitori H, Kuraishi A, Igarashi K. (1997): Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 272:6318-23.
- Kinraide TB (1981): Interamino acid inhibition of transport in higher plants. Plant Physiol 68: 1327-1333
- Kurepa J, Smalle J, Van Montagu M, Inze D (1998): Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat. Plant J. 14:759-64.
- Lasat MM, Hart JJ, DiTomaso JM, Kochian LV (1997): Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of paraquat-resistant *Hordeum glaucum* biotype. Plant Physiol 99: 255-262.
- Lehoczki E (1993): Fotoszintézis módosított összetételű kloroplasztisz membránokban Gyomnövények rezisztenciája fotoszintézisgátló herbicidekkel szemben. Tézisek a biol.tud.doktora fokozat megszerzéséhez, Szeged 46 pp.
- Lehoczki E, Laskay G, Gaál I, Szigeti Z (1992): Mode of action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Plant Cell Environ 15: 531-539.
- Lehoczki E, Szigeti Z (1988): Characterization of paraquat-resistant *Conyza* leaves through delayed fluorescence. In: Applications of Chlorophyll Fluorescence (ed. U.K. Lichtenthaler), pp. 115-120.
- Liang P, Pardee AB (1998): Differential display: A general protocol. Mol Biotechnol 10: 261-267.
- Lobreaux S, Massenet O, Briat JF (1992): Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. Plant Mol Biol. 19:563-75.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", Nucleic Acids Res, 32:327-331
- Morimyo, M. (1988) Isolation and characterization of methyl viologen-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 170, 2136-2142.

- Morimyo, M., Hongo, E., Hama-Inaba, H., and Machida, I. (1992): Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res.* 20, 3159–3165.
- Mornet C, Mondory C, Gaillard C, Martinoia E (1997): Transport of paraquat and polyamines across the vacuolar membrane of barley mesophyll cells. *Plant Physiol Biochem* 35: 589–594.
- Muller M. L., Taiz L. (2002): Regulation of the lemon-fruit V-ATPase by variable stoichiometry and organic acids. *J Membr Biol* 185: 209-220.
- Nicholas KB, Nicholas Jr HB (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml> Distributed by the authors
- Norman M. A., Fuerst E. P., Smeda R. J., Vaughn K. C. (1993): Evaluation of paraquat resistance mechanisms in *Conyza*. *Pestic Biochem Physiol* 46:236-247.
- Nozaki T, Nishimura K, Michael AJ, Maruyama T, Kakinuma Y, Igarashi K (1996) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228:452–458
- Paraquat Information Center, Syngenta Crop Protection AG <http://www.paraquat.com>
- Persson L, Svensson F, Lökvist Wallström E, (1996): Regulation of polyamine metabolism Polyamines in Cancer – Basic Mechanisms and Clinical Approaches (K. Nishioka ed.) pp. 14–43, R.G. Landes Company, Austin
- Petit JM, Briat, JF Lobréaux, S. (2001): Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem. J.* 359:575–582.
- Pistocchi R, Antogni F, Bagni N, Zanoni D (1990): Spermidin uptake by mitochondria of *Helianthus tuberosus* Plant Physiology 92:690–695
- Powles, S. B., Cornic G. (1987): Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. I. Studies with isolated organelles and enzymes. *Aust J Plant Physiol* 14: 81–89.
- Pölös E., Mikulás J., Szigeti Z., Hai D. Q., Párducz Á., Lehoczki E. (1987): Paraquat and atrazine co-resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Pestic Biochem Physiol.* 30: 142-148.
- Preston C, Holtum JA, Powles SB (1992): On the Mechanism of Resistance to Paraquat in *Hordeum glaucum* and *H. leporinum*: Delayed Inhibition of Photosynthetic O<sub>2</sub> Evolution after Paraquat Application. *Plant Physiol.* 100:630–636.
- Putman M, van Veen HW, Konings WN. (2000): Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:672–93.
- Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Perez-Lamela C, Simal-Gandara J, Arias-Estevéz M. (2006) Simultaneous determination of the herbicides diquat and paraquat in water. *J Chromatogr Sci.* 44:539–42.
- Rose MS, Lock EA, Smith LL, Wyatt I (1976) Paraquat accumulation: tissue and species specificity. *Biochem Pharmacol* 25: 419–423
- Ross JH, Krieger RI (1980): Synthesis and properties of paraquat (methyl viologen) and other herbicidal alkyl homologues. *J Agric Food Chem* 28:1026–1031
- Rotem D, Schuldiner S (2004): EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, transports monovalent and divalent substrates with the same stoichiometry. *J Biol Chem.* 279:48787–93.
- Ryan GF (1970): Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci* 18:614–16.
- Saitou N, Nei M (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406–25.
- Sambrook J; Fritsch EF and Maniatis T (1989): *Molecular cloning: laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.1626



- Schuldiner S (2007): Controversy over EmrE structure Science. 317:748-51.
- Schuldiner S (2007): When biochemistry meets structural biology: the cautionary tale of EmrE. Trends Biochem Sci. 32:252-8
- Seiler N, Dezeure F (1990) Poliamine transport in mammalian cells. Int J Biochem 22:211-218
- Shaalit Y, Gressel J, (1986): Multienzyme oxygene radical detoxifying system correlated with the paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. Pestic. Biochem. Physiol. 26, 22-28.
- Silverman FP, Petracek PD, Fledderman CM, Ju Z, Heiman DF, Warrior P. Salicylate activity. 1. Protection of plants from paraquat injury. J Agric Food Chem. 2005 Dec 14;53(25):9764-8.
- Smith LL (1982): The identification of an accumulated system for diamines and polyamines into the lung and its relevance to paraquat toxicity, Arch. Toxicol. Suppl. 5:1-14.
- Soulet D, Gagnon B, Rivest S, Audette M, Poulin R (2004): A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. J Biol Chem. 279:49355-66
- Su YH, Frommer WB, Ludewig U (2004): Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. Plant Physiol. 136:3104-13
- Swofford, D. L. 2001. PAUP\* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szigeti Z., (2000): A gyomnövények paraquatrezisztenciája a *Conyza canadensis* (L.) Cronq. példáján. Bot. Közlem. 86-87. kötet 1-2. füzet
- Szigeti Z., Rácz I., Lásztity D. (2001): Paraquat resistance of Weeds – the Case of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Z Naturforsch 65c: 319-328.
- The Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) <http://www.hracglobal.com>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997): The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools Nucleic Acids Res. 25:4876-82.
- Tiburcio AF., Altabella T, Borrell A, Masgrau C (1997): Polyamine metabolism and its regulation, Physiologia Plantarum 100:664-474
- Tippmann HF (2004): Analysis for free: comparing programs for sequence analysis Brief Bioinform. 5:82-7.
- Tomitori H, Kashiwagi K, Asakawa T, Kakinuma Y, J Michael A, Igarashi K (2001): Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast, The Biochemical Journal, 353:681-688.
- Tomitori H, Kashiwagi K, Sakata K, Kakinuma Y, Igarashi K (1999): Identification of a Gene for a Polyamine Transport Protein in Yeast , The Journal of Biological Chemistry 274: 3265-3267
- Toursarkissian B, Endean ED, Aziz SM (1994): Characterization of polyamine transport in rat aortic smooth muscle cells J Surg Res. 57:401-7.
- Uemura T, Kashiwagi K, Igarashi K (2007): Polyamine Uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*.The Journal of Biological Chemistry, 282: 7733–7741
- Uemura T, Tachihara K, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K (2005): Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation. J Biol Chem. 280:9646-52.
- USDA, NRCS. 2007. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov> , 14 February 2007). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

Varadi G, Darko E, Lehoczki E. (2000): Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. *Plant Physiol.* 123:1459-70.

Vaughn KC, Vaughan MA, Camilleri P (1989): Lack of cross-resistance of paraquat-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) to other toxic oxygen generators indicates enzymatic protection is not the resistance mechanism. *Weed Science* 37: 5-11.

Vaughn KC (2003): Herbicide resistance work in the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Manag Sci.* 59:764-9.

Vermeulen CJ, Van De Zande L, Bijlsma R (2005): Resistance to oxidative stress induced by paraquat correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster*. *BioGerontology* 6:387-95.

Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y (2004) CATs and HATs: the Park next to us or thereabouts, and our door is the one in front of where the cars are SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447: 532-542

Vile GF, Winterbourn CC, Sutton HC. (1987): Radical-driven Fenton reactions: studies with paraquat, adriamycin, and anthraquinone 6-sulfonate and citrate, ATP, ADP, and pyrophosphate iron chelates. *Arch Biochem Biophys.* 259:616-26.

Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby A. G., Augustijn Beckers, P. W. M. and Burt, J. P. (1992): SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123: 1-157

Weed Science Society of America. *Herbicide Handbook*, Seventh Edition. Champaign, IL, 1994

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* 27: 139-147

Won, B.-H. Lee and J. Jo (2000): Characterization of a paraquat resistance of *Ochrobactrum anthropi* JW2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1-7.

Wyatt I, Soames AR, Clay MF, Smith LL (1988) The accumulation and localization of putrescine, spermidine, spermine and paraquat in the rat lung. *Biochem Pharmacol* 37: 1909-1918

Wyse RE, Komor E (1984) Mechanism of amino acid uptake by sugar cane suspension cells. *Plant Physiol* 29: 865-870

Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S. (1995) EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H<sup>+</sup> and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem.* 270:6856-63.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>12 TM</b>    | 12 transzmembrán domén szerkezet  |
| <b>14 TM</b>    | 14 transzmembrán domén szerkezet  |
| <b>AAT1</b>     | Arabidopsis aminosav transzporter 1   |
| <b>ABC</b>      | ATP-binding cassette protein, ATP-kötő alegységgel bíró fehérje                                   |
| <b>ACT</b>      | aktin   |
| <b>AGP2</b>     | arabinogalaktán protein 2   |
| <b>APC</b>      | aminosav-poliamin-organokation transzporter fehérje   |
| <b>APX</b>      | aszkorbát peroxidáz   |
| <b>AtAAP</b>    | Arabidopsis thaliana aminosav-permeázok családja  |
| <b>AtANT</b>    | Arabidopsis thaliana aromás és neutrális aminosav transzporter                                    |
| <b>AtAUX</b>    | Arabidopsis thaliana auxin transzporter   |
| <b>ATF</b>      | amino acid transporter family, aminosavtranszporter család  |
| <b>AtFerr2</b>  | Arabidopsis thaliana ferritin 2   |
| <b>AtLHT</b>    | Arabidopsis thaliana lizin-hisztidin transzporter   |
| <b>ATP</b>      | adenozil-trifoszfát   |
| <b>AtProT</b>   | Arabidopsis thaliana prolin transzporter  |
| <b>CAD</b>      | kadaverin   |
| <b>CadB</b>     | kadaverin transzporter "B"  |
| <b>CAT</b>      | kataláz   |
| <b>CAT1-9</b>   | cationic amino acid transporter 1-9, kationos aminosavtranszporter                                |
| <b>cDNS</b>     | komplementer dezoxi-ribonukleinsav  |
| <b>DCCD</b>     | N4N1 -diciklohexil-karbodiimid  |
| <b>DDRT-PCR</b> | differential display reverse transcriptase polimerase chain reaction                              |
| <b>DNS</b>      | dezoxi-ribonukleinsav   |
| <b>dNTP</b>     | dezoxi-ribonukleotid trifoszfát   |
| <b>DUR3</b>     | ureatranszport protein 3  |
| <b>EmrE</b>     | etídium metil-viologén rezisztencia protein "E"   |
| <b>EP</b>       | extenziós peptid  |
| <b>EST</b>      | expressed sequence tag  |
| <b>Fv/Fm</b>    | változó és maximális fluoreszcencia hányadosa   |
| <b>GAP1</b>     | gamma-aminovajsav permeáz 1   |
| <b>Glu</b>      | glutaminsav   |
| <b>LIZ, Lys</b> | lizin   |
| <b>MATE</b>     | multidrug and toxic compound extrusion, multidrog - és toxikus ágenseket kilökő fehérjék családja |
| <b>MDR</b>      | multidrog-rezisztencia  |
| <b>MFS</b>      | major facilitator superfamily, a legfőbb facilitátor fehérjék családja                            |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>mvrA</b>   | metil-viologén rezisztencia protein „A”  |
| <b>mvrC</b>   | metil-viologén rezisztencia protein „C”  |
| <b>MYB</b>    | myeloblastoma transzkripció faktor   |
| <b>ORN</b>    | ornitin  |
| <b>PAM</b>    | pulzus amplitúdó moduláció   |
| <b>PCR</b>    | polimerase chain reaction, polimeráz lánreakció  |
| <b>pGOL</b>   | Post-Golgi partikulum  |
| <b>PMF</b>    | proton motive force, protonhajtóerő  |
| <b>PotA-I</b> | poliamin transzporter “A”-“I”  |
| <b>Pq</b>     | paraquat   |
| <b>PqrA</b>   | paraquat rezisztencia faktor “A”   |
| <b>PSI</b>    | a fotoszintézis I-es fotokémiai rendszere  |
| <b>PSII</b>   | a fotoszintézis II-es fotokémiai rendszere   |
| <b>PTK1</b>   | protein-kináz 1  |
| <b>PTK2</b>   | protein-kináz 2  |
| <b>PUT</b>    | putreszcin   |
| <b>PVS</b>    | poliamin szekvesztrációs vezikula  |
| <b>QacA</b>   | quaternary ammonium compounds transzporter   |
| <b>RND</b>    | resistance-nodulation-cell division, rezisztencia- noduláció-sejtosztódás- fehérjék családja |
| <b>RNS</b>    | ribonukleinsav   |
| <b>RT-PCR</b> | reverse transcriptase polimerase chain reaction  |
| <b>SAM3</b>   | S-adenozil metionin transzporter, élesztő  |
| <b>SMR</b>    | small multidrug resistance, kisméretű multidrog-rezisztencia fehérjék                        |
| <b>SOD</b>    | szuperoxid dizmutáz  |
| <b>SPD</b>    | spermidin  |
| <b>SPM</b>    | spermin  |
| <b>TAE</b>    | tris-acetát-etiléndiamin-tetraecetsav  |
| <b>TEXAN</b>  | toxin extruding antiporters, toxinkizáró antiporter család                                   |
| <b>TM</b>     | transzmembrán  |
| <b>TMD</b>    | transzmembrán domain   |
| <b>TMS</b>    | transzmembrán szegmens   |
| <b>TP</b>     | transzipeptid  |
| <b>TPO</b>    | transporters for polyamines, élesztő poliamintranszporter család                             |
| <b>TPP</b>    | tetrafenil-foszfonium-klorid   |
| <b>tpt</b>    | transzporter   |
| <b>UGA4</b>   | univerzális gamma-aminovajsav transzporter   |
| <b>VAC</b>    | vakuólum   |
| <b>YAT</b>    | Yeast Amino acid Transporter, élesztő aminosav transzporter                                  |

## ÖSSZEFOGLALÁS

A gyomnövények ellen a világon legszélesebb körben alkalmazott herbicidek egyike a paraquat. Intenzív használata következtében az elmúlt évtizedekben egyre gyakrabban jelentek meg a gátlószerrerrel szemben toleráns és rezisztens gyomfajok. Számos elmélet kívánt magyarázatot adni a rezisztenciafaktorában kiemelkedő betyárkóró (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.) paraquat rezisztenciájára, azonban egyik sem bizonyult cáfolhatatlannak.

Munkám célja a betyárkóró paraquattal szembeni rezisztenciamechanismusának feltárása volt, melynek során az alábbi fontos megállapításokat tettem:

A rezisztencia oka a szekvesztráció, melynek során a paraquat metabolikusan inaktív kompartmentbe, a vakuólumba jut. Kimutattam, hogy a szekvesztrációs mechanizmusban központi szerepet tölt be egy, az ABC-fehérjétől különböző transzporter. Ez a transzporter protein a szekvenciaelemzések alapján az *Arabidopsis* CAT4 kationos aminosav transzporter homológja, mely a 14-transzmembrán doménnel rendelkező aminosav-poliamin-kolin (APC) transzporterek családjába tartozik. A CAT4 homológián elvégzett *in silico* elemzésekkel kimutattam a transzmembrán fehérje azon kötőhelyeit, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a szubsztrát putreszcinhez hasonló töltéseloszlású paraquat kötésében és transzportjában.

A CAT4 a tonoplazton lokalizált; a paraquatot vakuoláris térbe szállító transzporter energiaigényéhez protongrádiens biztosító vakuoláris H<sup>+</sup>-ATPáz specifikus gátlása esetén a paraquat rezisztencia megszűnt. A CAT4 expressziója paraquat kezelés hatására indukálódott, mely indukció a rezisztens növényben lényegesen nagyobb mértékű volt, mint a szenzitívben. A rezisztencia mechanizmus hátterében a CAT4 fehérje szerkezetének módosulásából eredő, paraquattal szemben megnövekedett affinitása, illetve fokozott expressziója révén a vakuoláris membránon nagyobb számban elhelyezkedő transzporterek eredményezte intenzívebb paraquat-transzport állhat.

A citoplazmatikus vas atomok a gátlószer alkalmazását követően a paraquatot kölcsönhatásba lépve membránkárosító hidroxil-gyököket generálnak, így a vaskötő fehérjék szerepe a paraquat kezdeti károsító hatásának mérsékelésében kulcsfontosságú. Bebizonyítottam, hogy a szabad vas atomok kötéséért felelős ferritin expressziós szintje a szenzitív és a rezisztens betyárkóróban egyaránt megnövekedett a gátlószer hatására.

Az expresszálandó szekvenciaregionok alapján meghatároztam a teljes ferritin gént és elhelyeztem a genomikai adatbázisokban. A ferritin filogenetikai törzsfájának elemzésével megállapítottam, mely, már ismert genomú növényfajok állnak legközelebb molekuláris szempontból a betyárkóróhoz.

Összegezve: molekuláris biológiai és *in silico* elemzésekkel sikerült alátámasztanom azt a hipotézist, mely szerint a betyárkóró rezisztens biotípusú növényében a CAT4 kationos aminosav transzporter a paraquatot metabolikusan inaktív partikulumba, a vakuólumba szekvesztrálja, emellett az átmeneti védekezésben a ferritin csökkenti a paraquat regenerációját és kezdeti károsító hatását.

## SUMMARY

Paraquat belongs to one of the widest used herbicides against weeds. Its intensive use caused increasing appearance of tolerant and resistant species against the herbicide. There are several theories explaining the resistance and outstanding resistance factor of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.) but none of them proved to be irrefutable.

The aim of my work was the definition of the mechanism of resistance of horseweed against paraquat, where I made the following important suggestions:

The cause of resistance is the sequestration, where paraquat ends in the metabolic inactive compartment vacuole. I demonstrated the key role of a transporter protein in the sequestration mechanism that differs from ABC-transporters. Based on sequence analysis the protein is a homologue of *Arabidopsis* cationic amino acid transporter CAT4, which belongs to the 14 transmembrane subfamily of APC (Amino acid- Polyamine- Choline) transporters. I showed with *in silico* analysis the putative key positions in the primary sequence of the protein, where binding and transport of paraquat may occur according to the similarities of charge distribution of paraquat and natural substrates like cationic amino acids and polyamines.

CAT4 is localized on the tonoplast; the phenomenon of paraquat resistance could be eliminated by the use of specific inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase which supplies the proton gradient needed for CAT4 and paraquat translocation into the vacuole. CAT4 showed paraquat treatment induced expression especially in the case of resistant biotype of horseweed. The background of the resistance mechanism may be the increased affinity of transporter against paraquat caused by modification in the structure of CAT4 protein or the more intensive paraquat transport caused by the higher expression and enlarged number of CAT4 transporter proteins.

Following the use of inhibitor cytoplasmic iron reserves interact with paraquat building hydroxyl radicals that damage membranes therefore iron binding proteins have a key role during the initial phase of the destruction effect of paraquat. I verified that paraquat treatment increased the expression level of the iron binding protein ferritin in both sensitive and resistant biotypes of horseweed.

Derived from expressed sequence tags I identified the whole coding sequence of ferritin and uploaded the data into genomic databases. Based on the analysis of the phylogenic tree of ferritins I showed molecularly neighbor species possessing a known genome that stands the nearest to horseweed.

These molecular and *in silico* biological results support the hypothesis that in the resistant biotype of horseweed paraquat is sequestered into a metabolic inactive particle vacuole and this transport occur through the cationic amino acid transporter CAT4 moreover ferritin reduces during initial phase of protection the further damaging effects and regeneration of paraquat.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Gyurján Istvánnak és Dr. Szigeti Zoltánnak, hogy a Ph. D. tanulmányaimat az általuk vezetett „*Kísérletes Növénybiológia*” doktori programban végezhettem az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Karán.

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Lásztity Demeternek és Dr. Rác Ilonának a szakmai vezetésért, a rengeteg tudományos és emberi támogatásért.

Köszönöm Dr. Soós Vilmos kollegámnak, hogy mindig szakított időt kérdéseim megválaszolására. Hasonlóképpen köszönöm az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Molekuláris Növénybiológia és Növényélettani Tanszékén dolgozó munkatársaknak, név szerint Dr. Bratek Zoltánnak, Dr. Rudnóy Szabolcsnak, Szegő Dórának, Dr. Halász Krisztiánnak, valamint Tóth Attiláné asszisztensnek, hogy akár eszközökkel, akár hasznos tanácsokkal segítették munkámat.

Köszönöm jelenlegi munkatársaimnak, a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Molekuláris Terápia Labor és a KPS Orvosi Biotechnológiai és Egészségügyi Szolgáltató Kft. részéről, hogy türelemmel viselték dolgozatom megszületését.

Köszönet illeti Dr. Székely Annát, Dr. Boross Pétert, Dr. Kalmár Évát, Dr. Varga Mátét és Dr. Rancz Ede Attilát, akikhez bármikor fordultam, kérdéseimre mindig választ adtak és mindvégig bátorítottak.

Végül családomnak és szüleimnek mondanék köszönetet. Az ő kitartásuk, szeretetük és támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

# AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

## REFERÁLT TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT CIKKEK:

Soós V., Páldi E., Jóri B., Szigeti Z., Rácz I., Lásztity D. (2006): Ferritin2 gene in paraquat susceptible and resistant biotypes of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Journal of Plant Physiology*, 163(9):979-982.

Jóri B., Soós V., Szegő D., Páldi E., Szigeti Z., Rácz I., Lásztity D. (2007): Role of transporters in the paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(1):57-65

## TOVÁBBI TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT CIKKEK:

Visnovitz T., Soós V., Jóri B., Rácz I., Szigeti Z. (2008): Staying alive: Insight into the resistance mechanism of *Conyza canadensis* to xenobiotic paraquat. *Acta Biologica Iugoslavia Seria Acta Herbologica*, 17:173-178

## REFERÁLT TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT KONFERENCIA KIVONATOK:

Soós V., Jóri B., Szegő D., Páldi E., Szigeti Z., Rácz I., Lásztity D. (2005): Paraquat-induced genes in horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *FEBS Journal*, Vol 272. Suppl., p. 429.

Soós V., Jóri B., Szegő D., Bratek Z., Rácz I., Lásztity D. Szigeti Z. (2005): Role of transporters in the mechanism of paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Acta Biologica Szegediensis*, 49: 191-193.

Szigeti Z., Soós V., Jóri B., Rácz I., Lásztity D. (2004): Resistance of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 26. Suppl., p. 227

Halász K., Soós V., Jóri B., Rácz I., Lásztity D., Szigeti Z. (2002): Effect of transporter inhibitors on paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Acta Biologica Szegediensis*, 46.(3-4): 23-24.

## ÖSSZEFOGLALÓK KONFERENCIA KIADVÁNYOKBAN:

Szigeti Z., Visnovitz T., Jóri B., Soós V., Lásztity D., Rácz I. (2009): Insight into the Resistance Mechanism of *Conyza canadensis* to Xenobiotic Paraquat. *International Conference of Plant Abiotic Stress Tolerance*, Vienna, Austria; p. 142

Szigeti Z., Soós V., Jóri B., Páldi E., Rácz I., Lásztity D. (2006): Transporters in the paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Proc. of the 15th FESPB Congress Lyon, France*; p. 157.

Szigeti Z., Jóri B., Soós V., Páldi E., Rácz I., Lásztity D. (2006): Role of transporters in the paraquat resistance of horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Proc. of the 3th EPSO Conference Visegrád, Hungary*; p. 164.

Soós V., Szigeti Z., Jóri B., Rácz I., Bratek Z., Lásztity D. (2004): Novel aspects of the paraquat resistance of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Proc. of the 4th International Weed Science Congress, Durban, Republic of South Africa*; p. 53.

Jóri B., Lásztity D., Soós V., Rácz I., Szigeti Z. (2004): Paraquat resistance and polyamine transporters. *Proc. of the 4th International Weed Science Congress, Durban, Republic of South Africa*; p. 50.

Szigeti Z., Soós V., Jóri B., Rácz I., Lásztity D., Lehoczki E. (2004): Paraquat resistance of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Proc. of the 4th International Weed Science Congress, Durban, Republic of South Africa*; p. 40.

Halász K., Soós V., Jóri B., Rácz I., Lásztity D., Szigeti Z. (2002): Influence of transporter inhibitors on paraquat resistance in horseweed (*Conyza canadensis* /L./ Cronq.). *Proc. of European Workshop of ESSA, Varna, Bulgaria*; p.27.

## TOVÁBBI KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Jóri B (2004): Növényi genomika, *Botanikai közlemények* 91:39-55