BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR NÖVÉNYÉLETTAN ÉS NÖVÉNYI BIOKÉMIA TANSZÉK

## LEVÉLROZSDA ILLETVE KADMIUM ÁLTAL INDUKÁLT VÁLTOZÁSOK BÚZA ÉS ÁRPA APOPLASZT FEHÉRJEMINTÁZATÁBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Pós Veronika

TÉMAVEZETŐ: Dr. LUKÁCS NOÉMI, DSc

BUDAPEST 2010.

A doktori iskola megnevezése:	Interdiszciplináris (Kertészettudományi) Doktori Iskola
tudományága:	Biológiai tudományok
vezetője:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszék
Témavezető:	Dr. Lukács Noémi egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növényélettan és Növényi BiokémiaTanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

Dr. Tóth Magdolna Az iskolavezető jóváhagyása Dr. Lukács Noémi A témavezető jóváhagyása A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2010. 10. hó 05-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

### BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

### Elnöke

Bernáth Jenő, DSc

### Tagjai

Palkovics László, DSc Gelencsér Éva, CSc Király Zoltán, MHAS

### Opponensek

Gullner Gábor, CSc Papp István, PhD

### Titkár

Sárosi Szilvia, PhD

# TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 A NÖVÉNYI STRESSZFOLYAMATOK	
2.1.1 BÚZA – LEVÉLROZSDA KÖLCSÖNHATÁS	6
2.1.1.1 A patogén életciklusa, levélrozsda-patotípusok	
2.1.1.2 A gazdanövény védekezésének genetikai alapjai	9
2.1.1.2.1 A levélrozsda rezisztenciagének és forrásaik	9
2.1.1.2.2 A búza válaszreakciói a levélrozsda fertőzésre	10
2.1.2 A KADMIUM-STRESSZ	14
2.1.2.1 Növényi toxicitás és védekezési stratégiák	15
2.1.2.2 Nehézfémstressz hatása a globális fehérjemintázatra	19
2.1.2.3 Nehézfémek hatása a sejtközötti állományba kiválasztott fehérjékre	
2.2 AZ APOPLASZT	
2.2.1 Az apoplaszt proteomikája és stresszválasza	
2.2.2 Apoplaszt proteoma-adatbázisok	
	20
2.3 A FEHERJE SZINTU STRESSZVALASZ	
2.3.1 A PR FEHERJEK.	
2.3.1.1 Kitinazok es glukanazok	
2.4. A NÖVÉNYI STRESSZFOLYAMATOK RENDSZER SZINTŰ MEGKÖ	ZELÍTÉSE41
2.4.1 A gabonafélék proteomikája	45
3. CÉLKITŰZÉS	
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
4.1. Kísérleti növényanyag és mintaelőkészítés	
4.1.1. A faitaválasztás háttere	
4.1.2. Növénynevelés	51
4.1.3. A stresszkezelések kivitelezése	51
4.1.3.1. A búza levélrozsda-fertőzése	51
4.1.3.2. A kadmium-kezelés árpán	
4.1.4. Mintavétel	
4.2. Reagensek	53
4.3. Fehérje-szintű vizsgálatok	53
4.3.1. Apoplaszt fehérjék (ICF) kinyerése	53
4.3.1.1. A fehérjemennyiség meghatározása	54
4.3.1.2. Az apoplasztfolyadék koncentrálása	54
	_

4.3.2. Proteomikai analízis	54
4.3.2.1. Az apoplaszt-fehérjék elválasztása	54
4.3.2.1.1. Egydimenziós, denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézis (1D-PAGE)	54
4.3.2.1.2. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)	55
4.3.2.1.2.1. Izoelektromos fókuszálás (IEF - 1. dimenzió)	55
4.3.2.1.2.2. A minták ekvilibrálása	56
4.3.2.1.2.3. Denaturáló PA-gélelektroforézis (SDS-PAGE – 2. dimenzió)	56
4.3.2.1.3. A gélek festése	56
4.3.2.1.4. A gélek dokumentációja és a gélképek kiértékelése	56
4.3.2.2. Tömegspektrometriai analízis	56
4.3.3. Enzimaktivitás vizsgálatok	57
4.3.3.1. Extracelluláris endo-1,3-beta-D-glükozidáz – assay	57
4.3.3.2. Extracelluláris kitináz – assay	58
4.4 RNS-szintű vizsgálatok	58
4 4 1 Nukleinsav izolálás és tisztítás	58
4 4 1 1. Telies RNS izolálás	58
4 4 1.2 Totál RNS-kivonat DNS-mentesítése	59
4.4.1.3. DNS-mentesített totál RNS-kivonat kloroformos tisztítása	
4.4.2. Nukleinsavak elválasztása	60
4.4.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	60
4.4.2.2. Agaróz gélelektroforézis	60
4.4.3. RT-PCR	60
4.4.3.1. Primertervezés	60
4.4.3.2. Reverz transzkripció (RT)	61
4.4.3.3. Hagyományos polimeráz láncreakció (PCR)	61
4.4.4. PCR termékek klónozása	62
4.5. Szekvenciaanalizis	04
4.6. Törzsfakészítés	64
5 EREDMÉNVEK	65
	, UJ
5.1 Levélrozsda-fertőzés analízise fogékony és rezisztens, közel izogén búzavonalakon	65
5.1.1 Apoplaszt-proteomikai vizsgálatok a búza levélrozsdafertőzésével összefüggésben	65
5.1.2 Apoplasztikus enzimaktivitás vizsgálatok eredményei	77
5.1.2.1 EC endo-1,3-glükanáz assay eredményei	77
5.1.2.2 EC kitináz assay eredményei	79
5.1.3 Transzkripciós analízis indukálódó glükanáz és kitináz izoformákon	81
5.1.3.1 Putatív 1,3-glükanáz transzkriptumok amplifikálása proteomikai eredményekre alapozva	82
5.1.3.1.1 Szűk körre specifikus endo-1,3-glükanáz primerek alkalmazása	82
5.1.3.1.2 A glüko-hidroláz 17. család- ill. alcsalád-specifikus primerek tervezése	84
5.1.3.2. Putatív kitináz transzkriptumok amplifikálása proteomikai eredményekre alapozva	
5.1.3.2.1 Szűk körre specifikus kitináz primerek alkalmazása	88

	5.1.3.2.2. Általános kitináz primer (glüko-hidroláz 19. család) alkalmazása	94
5	1.3.3. Levélrozsda indukált glükanáz és kitináz izoformák kezdeti génexpressziós vizsgálatai	98
5.2	Kadmium-kezelt árpa apoplasztjának elemzése	
5.2.	Kadmium-stresszel asszociált változások az árpa apoplaszt fehérjemintázatában	100
53	Púze referencia anonlaczt térkénezése	110
5.5	Buza referencia apoplaszt ter kepezese	110
. <u>vöv</u>		
6. KOVE	IKEZIEIESEK	118
6.1	Levélrozsda indukálta stresszválasz fehérje- és RNS-szintű analízisének elemzése köz	zel
izogén	, cv. Thatcher-alapú búzavonalakban	
6.1.	A búza levélrozsda-fertőzésre adott extracelluláris stresszválasz proteomikai értékelése	118
6	1.1.2. Az ICF fehérjemintázatának alkalmassági kérdései (érzékenység, specificitás) a búza levé	lrozsda-
fe	rtőzés ill. rezisztenciaformák felismerésében	118
6.1.2	A búza levélrozsda-fertőzésre adott stresszválaszának apoplaszt endo-1,3-glükanáz és kitináz ak	tivitás
alap	í értékelése	119
6.1.	A búza levélrozsda fertőzésre adott stresszválaszának értékelése endo-1,3-glükanáz és kitináz iz	oformák
trans	zkripciós vizsgálatán keresztül	120
6.2	A kadmium-kezelt árpa extracelluláris proteomikai analízisének értékelése	
6.2.	Módszertani értékelés az egy- és kétdimenziós elválasztás, valamint a kétféle MS-technológia	
össz	evethetőségéről	123
6.2.2	Funkcionális értékelés az azonosított fehérjék kadmium-stresszben feltételezett szerepeiről	124
6.2.3	A kadmium és a levélrozsda elleni védekezésben egyaránt érintett PR családok indukciós	
meh	anizmusának hátteréről és jelentőségéről	125
6.3	A Chinese Spring referencia-apoplaszt térképezés jelenlegi fázisának értékelése	
6.3.	A búza apoplaszt referencia-fehérje térképezés módszertani és bioinformatikai korlátai	128
6.3.2	Az eddigiekben azonosított referencia apoplasztfehérjék lehetséges szerepkörei	
64	Kitekintés	132
		102
7. UJ TO	DOMANYOS EREDMENYEK	137
8. ÖSSZ	EFOGLALÁS	140
9. MELI	ÉKLETEK	143
M1. A	z azonosított húza ill. árna anonlasztfehériék szakirodalmi és funkcionális relevanciái	a 143
	M1.1 A levélrozsdával asszociáltan indukálódó búza apoplasztfehériék	
	M1.2 A kadmiummal kezelt árnában azonosított anonlasztfehériék	150
	M1.3 Egészséges búza csíranövényben azonosított apoplasztéhérjék	
N/0 I-	adalamiagyzák	145
N12. II	oualomjegyzek	105
KÖSZÖ	NETNYILVÁNÍTÁS	197

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

1D-PAGE:	egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis
2,4-D:	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
2D-(PAG)E:	kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis
A <sub>260</sub> /A <sub>280:</sub>	260 és 280 nm hullámhosszon mért UV elnyelések aránya
ABA:	abszcizinsav
ABA-GE:	abszcizinsav glükóz-észtere
ABC:	ATP-kötő kazetta (ATP-Binding Cassette) transzporter
ACC:	1-aminociklopropán-1-karboxilát
AO:	aszkorbát-oxidáz
APS:	adenozin 5'-foszfoszulfát (adenilil-szulfát)
APX:	aszkorbát-peroxidáz
ARS:	Agricultural Research Service (USDA)
AtPID:	<u>A</u> rabidopsis <u>thaliana</u> <u>P</u> rotein <u>I</u> nteractome <u>D</u> atabase
Avr:	avirulencia faktor (fehérje)
Avr:	avirulencia gén
BLAST:	adatbázis homológok keresésére alkalmas szekvenciaillesztő program
	( <u>Basic Local Alignment Search Tool</u> )
<b>BLASTP:</b>	protein BLAST
<b>BN-PAGE:</b>	natív poliakrilamid-gélelektroforézis (blue-native)
bp:	bázispár
CAT:	kataláz
CBB:	Coomassie Brilliant Blue (fehérjefesték)
CC:	hurkolt hurok domén ( <u>c</u> oiled <u>c</u> oil)
cDNS:	komplementer (complementer) DNS
CHS:	kalkon-szintáz
CID:	a peptidionok további fragmentálódát célzó, kollízió indukálta
	disszociáció (MS/MS)
ClustalW:	nukleinsav- ill. fehérjeszekvenciák többszörös illesztését lehetővé tévő
	programcsomag (European Bioinformatics Institute)
CM-Chitin:	karboximetil-kitin
dpi:	inokulációt követő napok száma (days post inoculation)
dbEST:	EST-adatbázis
DHAR:	dehidro-aszkorbát reduktáz
DIGE:	differenciál gélelektroforézis
DMF:	dimetil-formamid
DNS:	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP:	dezoxi-nukleozid trifoszfát
dT:	dezoxi-timidin
DTT:	ditiotreitol
DV:	desztillált víz
EC:	az International Union of Biochemistry and Molecular Biology
	nevezéktani Bizottsága (NC-IUBMB) által elfogadott enzimkatalógus
E /G	azonositoszámainak előtagja
E/S:	enzim-szubsztrát arány
EDTA:	etilén-diamin-tetraacetát

EMBL:	elsődleges nukleotid szekvencia adatbázis (Európa, European
	Bioinformatics Institute)
EPPdb:	Extracytosolic Plant Proteins Database (University of Alberta, Kanada)
EST:	PCR amplifikált cDNS részleges szekvenálásával nyert, kifejeződő STS-
	szekvencia ( <u>e</u> xpressed <u>s</u> equence <u>t</u> ag)
ET:	etilén
G(SH-)S:	glutation-szintáz
G6PDH:	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
GA:	gibberellinsav
Gb:	gigabázis
GenBank:	elsődleges nukleotid szekvencia adatbázis (National Center for
	Biotechnology Information, USA)
GIP:	endo-β-1,3-glukanáz inhibitor protein
GOGAT:	glutamát szintáz (glutamin oxoglutarát aminotranszferáz)
GR:	glutation-reduktáz
GS:	glutamin-szintáz
G-SH:	glutation (redukált)
GST:	glutation-S-transzferáz
GT:	glutamil-transzferáz
hpi:	inokulációt követő órák száma (hours post inoculation)
HR:	hiperszenzitív reakció
IC:	intracelluláris
ICF:	intercelluláris (mosó)folyadék
IDT:	Integrated DNA Technologies
IEF:	izoelektromos fókuszálás
IPG:	immobilizált pH gradiens
IPTG:	izopropil béta-D-tiogalaktopiranozid
IRH:	herbivorok által kiváltott rezisztencia (induced resistance against
	<u>h</u> erbivors)
ISR:	indukált szisztémás rezisztencia
IWR:	sebzésre indukálódó rezisztencia
JA:	jazmonsav (jazmonát)
kbp:	kilobázispár
<b>kD(a):</b>	kilodalton
kontig:	eltérő mértékben átfedő klónok illesztésével kapott, folytonos DNS
	szekvencia ( <u>contig</u> uous)
LEA:	késői embriogenezis (late embryogenesis abundant) fehérjék
LHC:	fénybegyűjtő komplex
Lr:	levélrozsda-rezisztenciagén
LRR:	leucinban gazdag ismétlődések (Leu-rich repeats)
LZ:	leucin-zipzár domén
<b>M:</b>	mol / liter koncentráció rövidítése
MALDI:	mátrixhoz asszociált lézer-deszorpciós ionizáció
MAMP:	mikróbával asszociált molekuláris mintázat (microbe-associated molecular
	<u>p</u> attern)
MAP(K):	mitogén-aktivált protein (kináz)
<b>MDHAR:</b>	monodehidroaszkorbát reduktáz
MEGA:	filogenetikai analizáló program <u>M</u> olecular <u>E</u> volutionary <u>G</u> enetics <u>A</u> nalysis)
MeJA:	metil-jazmonát
MgKI:	MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete (Martonvásár)

MQ:	ioncserélő gyantán (Milli-Q) megszűrt desztillált víz						
MS/MS:	tandem tömegspektrometria						
MS:	tömegspektrometria (mass spectrometry)						
MT:	metallothionein						
MTA:	Magyar Tudományos Akadémia						
MudPIT:	multidimenzionális fehérjeazonosítási technológia (Multi-dimensional						
	Protein Identification Technology)						
<b>M(W):</b>	molekulatömeg (Molecular Weight)						
NADPH:	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát						
NBS:	ciklikus nukleotidot kötő hely ( <u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding <u>s</u> ite)						
NBT:	nitro-tetrazólium-kék						
NCBI:	National Center for Biotechnology Information (National Library of						
NODI	Medicine es National Institutes of Health, U.S.A.)						
NUBINI:	nem redundans NCBI protein adatoazis						
NKI:	nitro sén monorid						
NU: NDD.	Indogen-monoxia						
NFF;	n-veg terminans szignaipeptid						
M. M. Ser-S.	O-acetil-szerin szulfuriláz						
$PAA \cdot$	poliakrilamid						
PAGE.	poliakrilamid gélelektroforézis						
PAL:	Phe-ammónia-liáz						
PAMP:	kórokozóval asszociált molekuláris mintázat (pathogen-associated						
	molecular pattern)						
$PC_{(2,3,etc)}$ :	fitokelatin(ok)						
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)						
PCS:	fitokelatin szintáz						
PGIP:	poligalakturonán-inhibitor protein						
PhytAMP:	növényi antimikrobiális peptidek adatbázisa						
PLACE:	edényes növények cisz-regulátor elemeinek motívumkereső és leíró						
	adatbázisa (A Database of <u>Plant C</u> is-acting Regulatory DNA <u>E</u> lements)						
PlantCare:	növényi cisz-regulátor elemeinek adatbázisa és egyben a						
	promóterszekvenciák in silico analízisét támogató eszközök portálja (Plant						
	<u>Cis-acting regulatory element</u> )						
PMSF:	fenilmetil-szulfonil-fluorid						
POD / POX:							
PK:	korfolyamattal osszefuggo (pathogenesis-related)						
ProtAnnDB:	Frotein Annotation DataBase						
PS: DSD.	rotorendszer						
<b>FSD:</b>	"post source decay – egy-egy Kivalasztott peptidion nagmentalasan alapuló szekvenálási módszer a MALDI TOF eljárásban, melyre az						
	enzimatikusan emésztett febériék ionizált pentidieinek pentidtömeg						
	ujilenvomat analízisét (PMF) követően nvílik lehetőség						
PTM:	poszttranszlációs módosítás						
aPCR:	kvantitatív PCR						
R/r:	rezisztencia fehérje						
<i>R / r</i> :	rezisztencia gén (domináns ill. recesszív)						
<b>RBV:</b>	Remazol Brilliant Violet						
ROS/(ROI):	reaktív oxigén-formák (/intermedierek)						
RPM:	percre vonatkoztatott fordulatszám (revolutions per minute)						
rRNS:	riboszómális RNS (ribonukleinsav)						

RT:	reverz-transzkripció
<b>RuBisCO:</b>	ribulóz-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz
SA:	szalicilsav
SAM:	S-adenozil metionin
SAR:	szisztémás szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance)
SDS:	nátrium-dodecil-szulfát
SHAM:	szalicil-hidroxámsav
SignalP:	pro- és eukarióta fehérje szignálpeptid jelenlétét és hasítóhelyet jósló
	program (Center for Biological Sequence Analysis, Dánia)
SOD:	szuperoxid-diszmutáz
SP:	szignálpeptid
SSH:	szupressziós szubtraktív hibridizáció
STS:	rövid (<400 bp), markerként is használható szekvenciarészlet a genomban
SWISS-PROT:	elsődleges fehérjeszekvencia-adatbázis (European Bioinformatics Institute és Swiss Institute of Bioinformatics)
SzBK:	MTA Szegedi Biológiai Központ (Szeged)
TAE:	Tris-ecetsav-EDTA elegye (részletek a szövegben)
TargetP:	eukarióta proteinek szubcelluláris lokalizációját jósló program (Center for
	Biological Sequence Analysis, Dánia)
TBE:	Tris-bórsav-EDTA elegye (részletek a szövegben)
TBLASTN:	fehérje szekvencia alapján transzlált nukleotid adatbázisban kereső BLAST
Tc:	Thatcher fajtájú búza genotípus
TCB:	triklórbenzén
TIGR:	The Institute for Genomic Research (J. Craig Venter Institute)
TLP:	taumatinszerű protein
TMV:	dohánymozaik-vírus
TOF:	repülési idő detektor ( <u>time of flight</u> )
TrEMBL:	az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisának transzlált változata SWISS-
	PROT formátumban
Tris:	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UCSF:	University of California, San Francisco
UDP:	uracil-biszfoszfát
USDA:	U.S. Department of Agriculture (az Amerikai Egyesült Allamok
	Mezőgazdasági Minisztériuma)
UV:	ibolyán túli (sugárzás)
WallProtDB:	sejtral proteoma-adatbàzis (Université Paul Sabatier, Toulouse és Centre
WDD	National de la Recherche Scientifique, Franciaorszag)
WKP: VDD.	sedzes indukalta rezisztencia protein
ADF: V colu	cukor-nukreotid(ok) 5 bromo 4 kloro 2 indelil báta D calalitarirszerid
A-gal: VCID.	J-DIOIIIO-4-KIOFO-J-IIIOOIII-DELA-D-galaktopiranozia
	xnogiukan endogiukanaz innibitor protein
γ-ΕСS:	gamma-giutamii-cisztein szintetaz

## 1. BEVEZETÉS

A mezőgazdasági növények termesztése során a nagy hozamot adó, értékes állományokat számos abiotikus (pl. fagyhatás, szárazság, UV-sugárzás) és biotikus (pl. kórokozók, rovarkártevők stb.) stressztényező veszélyezteti. Az érzékeny, ill. ellenálló fajok és fajták kiszűrésének és toleranciára vagy rezisztenciára nemesítésének előfeltétele, hogy egy kellően érzékeny módszer álljon rendelkezésünkre a növényi stresszállapot korai felismeréséhez és a védekezési folyamatok nyomon követéséhez.

A proteomika nagy felbontású és pillanatszerű felvételt képes adni egy élőlény (ill. kiválasztott szerve, szövete vagy sejtje) adott élettani állapotában kifejeződő fehérjéinek összességéről. Az anyagcsere-folyamatok közvetlen irányítóinak tartott proteinek ismeretében pedig az aktuális állapot jellemző tükrét kapjuk meg. A módszer, egy esetleges mintázati különbség fellépése esetén nemcsak arra alkalmas, hogy azonosítsa a megváltozott minőségű/mennyiségű fehérjéket (ill. génjeiket) és az érintett, általuk szabályzott anyagcsere-folyamatokat, hanem (kellő referencia birtokában) azt is lehetővé teszi, hogy a változás jellegéből a változást előidéző faktor mibenlétére, a kiváltott hatás erősségére és időbeli lefolyására is következtethessünk.

A növény sejtközötti állománya, vagyis az apoplaszt a külső környezet és a protoplaszt közti kapcsolatot és határvonalat is képviseli, éppen ezért a szövetek egy speciális, számos normál és kórfolyamatban aktívan közreműködő térrészének tekinthető. Proteomikai analízise emiatt a növényállományok jellemzésének és egészségügyi szűrésének kiváló eszközévé válhat, eredményeit pedig molekuláris nemesítési folyamatokban is felhasználhatjuk.

Az előbb taglalt, rendszerbiológiai szemlélet előnyeire alapozva biotikus és abiotikus stresszválasz kapcsán indukálódó, továbbá a preformált védekezésben potenciálisan közreműködő apoplasztfehérjék proteomikai elemzését végeztük különböző genotípusú, levélrozsda-fertőzött illetve egészséges búza, továbbá kadmium-stresszelt árpa csíranövényeken.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A NÖVÉNYI STRESSZFOLYAMATOK

A stressz, mint élettani fogalom bevezetése Selye János nevéhez fűződik (1936). A következetes nevezéktan hiányosságai (Levitt 1980, Tischler 1984) jól mutatják az aktuális kutatási területekre érvényes definiálás nehézségeit, és azt, hogy a jelenség, többek közt hatásai sokféleségének köszönhetően is számos különböző nézőpontból párhuzamosan közelíthető. Növényélettani megközelítése, Larcher (1987) értelmezésében: "egy olyan terheléses állapot, amelyben a növénnyel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizálódását követően, egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatás túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz" (Szigeti 1998). Így, a környezet meghatározott elemét akkor nevezhetjük stresszt kiváltó tényezőnek (stresszornak), ha a növény fiziológiájában olyan specifikus és aspecifikus változásokat okoz, amelyek az egyed életében élettani alkalmazkodást (akklim(atiz)ációt) eredményeznek, hosszabb távon, a populáció szintjén pedig a faj adaptációjához vezethetnek. Utóbbi értelemben tehát a stresszkiváltó faktorok szelekciós tényezőnek is tekinthetők. A mezőgazdasági növények termesztése során a nagy hozamot adó, értékes állományokat számos abiotikus és biotikus stressztényező veszélyezteti. Doktori munkám során mind biotikus, mind abiotikus stresszhatásokat vizsgáltunk rendszerbiológiai, pontosabban proteomikai megközelítéssel búza és árpa modell növényekben. A biotikus stressz esetében levélrozsda fertőzés, abiotikus stresszfaktorként kadmiumkezelés hatását analizáltuk. A következő fejezetekben e két stresszfolyamat jellegzetességeiről szeretnék áttekintést adni.

### 2.1.1 BÚZA – LEVÉLROZSDA KÖLCSÖNHATÁS

A *P. recondita* Rob. Ex Desm. f.sp. *tritici* (legújabb nevén *Puccinia triticina* Erikss.) heteroecikus bazídiumos gomba által okozott levélrozsda-fertőzés a búza egyik legjelentősebb betegségének számít világszerte. Széles elterjedtsége, nagy távolságokra terjedő spórái, optimális környezeti feltételek esetén gyors szaporodása és fertőzőképessége komoly, 15-30 %-os termésveszteségeket okoz (McIntosh 1998, Bolton *et al.* 2008, Purnhauser *et al.* 2008), de előbbiek mellett az egyik legnagyobb problémát állandóan változó és rendkívül széles rasszspektuma jelenti, amely a korábban már ellenállónak bizonyult fajtákkal szemben is visszatérő veszélyforrásként jelentkezik (Sibikeev *et al.* 2008). Utóbbira jó példa, hogy csak Észak-Amerikában évente megközelítőleg 70 új rasszát írják le a fajnak (Kolmer 2005). A legújabb források szerint erős szelekciós evolválódását hatékony klonális szaporodással is kiegészíti (Goyeau *et al.* 2007), s épp utóbbiak tehetőek felelőssé

a járványszerű tüntekért, különösen a megfelelő vagy alternatív köztesgazdákkal nem rendelkező termőterületeken (Bolton et al. 2008).

A gabonarozsdák hazánkban is a búza elterjedt betegségei voltak. Az első magyar búzanemesítő, Mokry Sámuel munkásságára (1875) nagy hatással volt az 1873. évi rozsdajárvány. Míg a sárgarozsda (P. striiformis Westend f. sp. tritici) továbbra is sporadikus felbukkanású, s a '70-es évek előtt hazánkban főként a szárrozsda (Puccinia graminis Pers. f. sp. tritici) okozott jelentős károkat, addig a levél- vagy másnéven vörösrozsda (Puccinia recondita f. sp. tritici) jelentősége az '50-es évektől kezdett fokozatosan növekedni, s napjainkra, a szárrozsda '80-as évekre tehető visszaszorulásával vált a hazai búzatermesztés egyik legjelentősebb kórokozójává (Benedek 1993, Csősz 2007). A nem megfelelő védettségű területeken súlyos levélrozsda-járványok alakultak ki 1994, 1995 és 1999-ben, napjainkra pedig a fajták fogékonyságától és az időjárás körülményeitől függően már szinte minden évben előfordul, kisebb-nagyobb károkat okozva (Csősz 2007). Amint világszerte, a rozsdapopuláció változó összetételét és rassz-arányait 1956-tól már hazánkban is rendszeres vizsgálatokkal ellenőrzik, eltérő rezisztenciagéneket hordozó izogén vonalakból felállított differenciáló sorok és az R izogén vonalakra alapozott határozókulcsok révén (Kolmer 1996, Manninger 1991, 2000, 2008). Az eltelt közel ötven év vizsgálatai azt mutatják, hogy ezidő alatt hazánkban is változások következtek be a búza levélrozsda rassz-összetételében. A MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete és az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete által végzett vizsgálatok szerint a populációkban évenként 10-20 különböző rasszt sikerül azonosítani, melyek közül néhány dominánsnak tekinthető (1. táblázat; Vida et al. 1999). A 2. táblázatból világosan kitűnik, milyen dinamikusan változott a 20. század második felében az egyes rasszok részaránya, és hogyan vált néhány év alatt dominánssá egy rezisztenciát áttörő rassz a hazai rozsdaállományban.

1. táblázat:	A domináns	rasszok	részaránya	(%)	a	magyarországi	levélrozsda	populációban
	(1961-1998). (	Forrás: V	ida <i>et al</i> . 1999	) nyomá	n)			

Éviárat	Rasszok						
Evjaral	20	77	61	12			
1961	73,8 %	18,5 %					
1966	12,0 %	40,7 %					
1970	1,0 %	52,0 %					
1984		57,4 %	35,4 %				
1989		56,7 %	28,7 %				
1994		32,5 %	41,7 %	3,1 %			
1998		12,5 %	15,0 %	35,0 %			

A hazai levélrozsda-populáció virulenciáját érintő legújabb fejlemény az 1999-es járvány utáni időszakban egy újabb, a 6-os számú rassz megjelenése, amely a hazai fajták Lr1-es rezisztenciagént hordozó vonalainak ellenállóképességét immár áttörve, rohamosan növeli részarányát a rozsdapopulációban (Manninger 2008).

### 2.1.1.1 A patogén életciklusa, levélrozsda-patotípusok

A búza levélrozsda (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) a bazídiumos gombák törzsébe (*ph. Basidiomycota*), a rozsdagombák (*o. Uredinales*) rendjébe tartozik. Micéliuma harántfalakkal tagolt. Heteroecikus (gazdacserés), teljes fejlődésmenetű rozsdagomba, melynél az összes spóraforma: 0, I / II, III és IV, megtalálható (Folk és Glits 1978). Életciklusa az 1. ábrán látható.



1. ábra: Búza levélrozsda (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) életciklusa. (*Forrás*: USDA ARS honlapja - http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad\_hoc/36400500Cerealrusts/prt-cycl.jpg)

Fő gazdanövénye a búza, köztes gazdanövényei a borkóró- (Thalictrum spp.), galambvirág-(Isopyrum spp), atracél- (Anchusa spp.), illetve az iszalag-fajok (Clematis spp.) (Csősz 2007). Ivaros képletei a különböző ivarú, vékony falú bazidiospórák (IV), ivartalan képletei: spermáciumok (0), ecídiumok (I), uredospórák (II) és teleutospórák (III). A bazidiospórák tavasszal a köztes gazdanövény leveleit fertőzik. A *Thalictrum* fajok leveleinek mindkét oldalán kis sárga, köcsög alakú spermogóniumok keletkeznek, bennük a spermáciumokkal (másnéven piknídiospórákkal). A levelek fonákán a dikariotikus sejtekből (spermácium + fogóhifa) kialakul a narancssárga, csésze típusú ecídium az ecídiospórákkal, melyek a főgazdát, a gabona leveleit fertőzik. A nyár folyamán a búza levelén elszórtan narancsvörös uredopusztulák jelennek meg (6. ábra), bennük a nyári fertőző uredospórákkal (2/b. ábra), melyek a széllel gyorsan terjednek. A vegetációs idő végén jelennek meg a búza levelének fonákán az apró teleutopusztulák a teleutospórákkal. Ezek már nem porzanak szét, lezajlik bennük a kariogámia és belőlük hajt ki a bazídium, melyen tavasszal ismét bazidiospórák képződnek (Folk és Glits 1978).

A búza – rozsdagomba interakció mind genetikai szinten, mind pedig a fertőzés stádiumai szerint is jól jellemzett. Pásztázó elektronmikroszkópos munkák alapján a fertőzéssel asszociált képződmények kialakulásának pontos időbeli menetét is sikerült dokumentálni (Hu és Rijkenberg 1998). Eszerint, 6 órával a fertőzést követően, a csírázó spórából kinyúló apresszórium képződik a gázcserenyílások felett, melynek sikeres behatolása a 12. órát követően már a sztóma alatti hólyagszerű képződmény (szubsztomatális vezikulum) megjelenésével is bizonyítható, illetve ekkorra az elsődleges infekciós hifa is láthatóvá válik a sejtközötti állományban. A fertőzést követő 24. órára egy határoló hártya (szeptum) is megjelenik az infekciós hifáról fejlődő hausztórium anyasejt elkülönítése céljából, majd a gomba parazitáló, nagy felületű, elágazó hausztóriumot képez és a sejtmembránba türemkedve benyomul a gazdasejtbe.



# 2. ábra: A búza levélrozsda (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) kórképe fő gazdanövényén és nyári szaporítóképletei (a.) Búza levélrozsda uredopusztulák a kifejlett levél felszínén, (b.) az uredospórák fénymikroszkópos felvétele.

(*Forrás*: USDA ARS és a Regione Emilia-Romagna honlapja (ERMES Agricoltura) - http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad\_hoc/36400500Cerealrusts/wlr\_gnhse2.jpg

- http://www.ermesagricoltura.it/Media/Images/Uredospore-di-Puccinia-recondita-f.sp.-tritici)

### 2.1.1.2 A gazdanövény védekezésének genetikai alapjai

### 2.1.1.2.1 A levélrozsda rezisztenciagének és forrásaik

A levélrozsda különböző patotípusaival szembeni rezisztenciát vizsgálva számos putatív rezisztenciagént azonosítottak. Ezek többsége különféle *Triticum aestivum* fajtákból származik, több *Lr* gén azonban rokon, vad alanyok korábbi bekeresztezése révén került be a búzába: *Aegilops umbellulata – Lr9*; *Aegilops squarrosa – Lr21*, *Lr22*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr40*, *Lr41*, *Lr42*, *Lr43*; *Agropyron elongatum – Lr19*, *Lr24*, *Lr29*; *Aegilops speltoides – Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47* és *Aegilops ventricosa – Lr37* (Chełkowski és Stępień 2001). A levélrozsda elleni rezisztencia kutatásában nagy jelentőségű, hogy természetes nemesítés eredményeképpen a Thatcher fajtában közel 60, a levélrozsda ellen eltérő rezisztenciagént hordozó búzavonalat állítottak elő különböző búzafajtákból, más termesztett gabonafélékből ill. rokon, vad fajokból származó introgresszióval

(McIntosh *et al.* 2007). A rezisztenciagének közül eddig az *Lr10* és *Lr21* (Feuillet *et al.* 2003, Huang *et al.* 2003), legújabban pedig az *Lr1* (Cloutier *et al.* 2007) rezisztenciagén térképezése és izolálása, ill. klónozása történt meg. Ezek alapján az állapítható meg, hogy a kódolt rezisztenciafehérjék közül mindhárom a klasszikus CC-NBS-LRR típus tagja (Hammond-Kosack és Kanyuka 2007), de az Lr1 fehérje egyedi jellegeket is hordoz. Így az Lr1 egy transzmembrán domént visel szignálpeptidjén, amely az intracelluláris jellegű Lr10 és Lr21 fehérjékkel szemben membrán-komplexben való feltételezett részvételére utalhat az Avr-R géntermékek közti kapcsolatot magyarázó őr-hipotézis alternatívájának megfelelően (Bonas és Lahaye 2002). Továbbá nem egy, hanem számos hurkolt hurok (CC) doménnel bír, amelyek nemcsak a szokásos N-, hanem a C-terminálison is előfordulnak, amint azt korábban az Lr21-nél is megfigyelték.

Kísérleteinkhez két genotípust, az *Lr1* ill. az *Lr9* rezisztenciagént hordozó, cv. 'Thatcher' (Tc) alapú vonalakat választottunk. Az utóbbi évtized kutatásai alapján úgy tűnik, hogy a Közép-Európában jelenleg dominánssá váló levélrozsda-patotípusok egyrésze képes a kizárólag *Lr1* gént hordozó fajták rezisztenciáját áttörni, míg az Lr9 rezisztenciát hordozó vonalak továbbra is megőrizték csíranövénykori ellenállóságukat (Chełkowski és Stępień 2001, Limpert *et al.* 1996, Csősz *et al.* 2000, Gultyaeva *et al.* 2000, Manninger 2000, 2008). Noha az *Lr1* gént széles körben *Triticum aestivum*-ból eredeztetik, ortológokra és térképezésre alapozott újabb vélekedések szerint a diploid (DD genomot adó) *Aegilops tauschii*-ban fejlődhetett ki, de csak viszonylag későn, így már a kenyérbúza domesztikálódása alatt vagy azt követően, ismételt introgresszióval kerülhetett az AABBDD genomba (Chełkowski és Stępień 2001 vs. Obert *et al.* 2005, Nocente *et al.* 2007). Az *Lr9* gén biztosan a közeli rokon *Aegilops umbellulata*-ból származik. A térképezések alapján (2. táblázat) az *Lr1* gén a hexaploid búza 5 DL, míg az *Lr9* gén a 6 BL kromoszómáján lokalizált (Feuillet *et al.* 1995, Schachermayr *et al.* 1994).

**2. táblázat:** A vizsgálni kívánt hatású levélrozsda-R gének származása és lokalizációja. A bizonytalan származás zárójelbe téve szerepel. (*Forrás:* Chełkowski és Stępień 2001 nyomán, módosítva)

Rezisztenciagén	Származás	Lokalizáció	Genetikai marker	Hivatkozás
Lr1	Triticum aestivum	5 DL, (1B)	RFLP, STS	Feuillet et al. 1995,
	(Aegilops tauschii?)			Obert <i>et al.</i> 2005
Lr9	Aegilops	6 BL	RFLP cMW 684, STS,	Schachermayr et al. 1994
	umbellulata		RAPD, RFLP PSR 546	

### 2.1.1.2.2 A búza válaszreakciói a levélrozsda fertőzésre

Bár kísérleti úton bizonyítható, hogy mely rezisztenciagének milyen patotípussal szemben biztosítanak ellenállóságot (pl. az *Lr1* rezisztenciagént bizonyos, alacsony patogenicitással jellemezhető rasszok ellen tartják eredményesnek – Kolmer *et al.* 1996; Browder 1980), és a

feltételezett rezisztenciagének is kereshetők már genetikai úton a gazdanövényben (Chełkowski és Stępień 2001; Khan *et al.* 2005), a rezisztencia mechanizmusáról és lefolyásának esetleges molekuláris különbözőségeiről nem sokat tudunk.



3. ábra: (a.) Csíranövényeken ill. (b.) kifejlett egyedek zászlós levelein megnyilvánuló, különböző tünetekben testet öltő levélrozsda-rezisztencia típusok Thatcher búzafajta közel-izogén vonalain. Balról jobbra: Tc – fogékony (b.o.), majd: Lr12, Lr13 és Lr34 rezisztens vonalak. (Forrás: USDA ARS - http://www.ars.usda.gov/pandp/people/people.htm?personid=3094)

Régóta ismert, hogy a különböző rezisztenciagéneket hordozó vonalak más-más morfológiai tüneteket mutathatnak (3. ábra), melyben a tünetek jellege (pl. HR vagy sporulációt engedő), intenzitása és időzítése is különböző lehet. Legtöbbjük rassz-specifikus, de előfordulnak széles körben, akár más, rokon rozsdafajokkal szemben is hatékony gének (pl. *Lr34*). Többségük már csíranövénykortól (pl. *Lr1, Lr9*), mások (pl. *Lr12, Lr 22a, Lr22b, Lr35, Lr37*) a kifejlett egyedek fertőzése esetében nyújtanak védettséget (3. táblázat).

**3. táblázat:** Levélrozsda-rezisztenciagének által biztosított, eltérő rezisztencia-típusok. Több Lr gén kombinálódása (piramidálás) esetén a legerősebb episztatikus a többi tünete felett. (*Forrás:* Bolton *et al.* 2008 adatai nyomán, szerk.)

A rezisztencia	l r gán (páldo)	Fenotípusos válasz			
patogén köre	LI gen (peida)	Időzítés A tünetek jelleg		ek jellege	
rassz-specifikus	Lr3	ocíronövénykori	Hiperszenzitív reakció (HR)	erőteljes foltokkal	
	Lr2a			enyhe foltokkal	
	Lr3ka, Lr3bg, Lr11	CSITATIOVETTYKOT	kisobb urodíniumok	+ klorotikus gyűrű	
	Lr16		KISEDD UIEUIIIIUIIIOK	+ nekrotikus gyűrű	
	Lr12, Lr13, Lr22a	felnőtt egyedben erőteljesebb	HR vagy kevés uredíniumú típusok		
nem rassz-specifikus	Lr34	felnőttkori	kisebb, ritkább uredíniumok	klorózis / nekrózis nélkül	
	Lr46		"lassan spórázók"	+ klorózis	

Kifejeződésüket egyes esetekben egyéb környezeti feltételek, pl. *Lr13, Lr37* esetében hőstressz vagy hideg is befolyásolják (Bolton *et al.* 2008). A bizonytalanságot tovább erősítik a gazdanövény genetikai hátteréből adódó eltérések. Az *Lr35* gén kapcsán például Anguelova és mtsai azt találták,

hogy míg Thatcher vonalba épülve az *Lr35* által kiváltott rezisztencia a fogékony Tc-ben tapasztalt erős indukcióval szemben konstitutívan magas béta-1,3-glükanáz szinttel volt jellemezhető (1999), addig Lr35/Karee genotípusban a hasonló ellenállóképesség egyértelműen indukált glükanáz, de konstitutív kitináz akitvitással volt társítható (2001). Ugyanazen gén jelenléte egyes búzavonalakban nagyobb fehérjetartalommal is asszociált (Kolmer 1997).

A betegség kialakulásának molekuláris hátteréről még csak kevés tény ismert, bár számos gént ill. fehérjét sikerült azonosítani, amelyek a gazda-patogén válasz kialakulásában közreműködnek. Ezek közt a rezisztens kölcsönhatásban szereplő gének (Kolmer 1996), valamint többek közt antifungális hidrolázok, pl. glükanázok és kitinázok (Faris *et al.* 1999, Anguelova-Merhar *et al.* 2001), RN-ázok (Barna *et al.* 2004), továbbá protein kinázok (Lin *et al.* 1998) és a reaktív oxigén gyökök termelésében szerepet játszó enzimek (Johnson és Cunningham 1972, Southerton és Deverall 1990, Faris *et al.* 1999) génjei egyaránt előfordulnak.

A rozsda - búza kölcsönhatást Rohringer munkacsoportja a '60-as évek végétől tanulmányozza, s a korai, metabolit szintű vizsgálatok után, a '80-as évek közepétől a sejtközötti állomány fehérjéinek proteomikai analízisét is megkezdték (Rohringer *et al.* 1983, Holden és Rohringer 1985a,b). Eredményeik között számos, eltérően expresszálódó béta-1,3-glükanáz, peroxidáz és kitináz izoforma fiziko-kémiai jellegű és/vagy aktivitáson alapuló elkülönítése szerepel. Mivel azonban a nagy felbontású 2D-poliakrilamid gélek kiértékeléséhez akkortájt még nem állt rendelkezésre megfelelő tömegspektometriai eszköztár és szekvencia-adatbázis, projektjükben a fehérje szintű vizsgálatokról a hangsúly más módszerekre (aktivitás assay-ek, immuncitokémia, fluoreszcens- és elekronmikroszkópia, ld. Sock *et al.* 1990) tevődött át idővel.

A témát a '90-es évek végétől egy dél-afrikai munkacsoport újra felkarolta, s kiterjedten vizsgálták az *Lr29, Lr34* ill. *Lr35* rezisztenciagének hatását a szekretált kitináz és glükanáz formák aktivitására (Kemp *et al.* 1999, Anguelova *et al.* 1999, Anguelova-Merhar *et al.* 2001). Ennek alapján úgy tűnik, az említett enzimek egyes esetekben konstitutív, máskor indukált expresszióval járulnak hozzá a rezisztenciához, de olyan is előfordult (a fogékony Palmiet és két rezisztens, Lr29 ill. Lr34 genotípusában), amikor nem lehetett különbséget megfigyelni a fertőzés hatására indukálódó glükanázok aktivitásában a közel izogén vonalak között. Hovatovább, léteznek olyan kutatások is, amelyek fogékony fertőzött egyedben a rezisztensét is meghaladó kitináz aktivitást figyeltek meg (Punja és Zhang 1993). Mindez arra utal, hogy az említett hidrolázok, bár közvetett módon, kigészítő jelleggel, de mégis szerepet játszhatnak a levélrozsda-rezisztencia kialakításában.

Hosszú időt követően, a 2000-es évektől újra proteomikai vizsgálatok következtek. Teljes kivonatot felhasználva előbb Lukács Noémi munkacsoportja (Lukács Noémi, személyes közlés, 2003), majd Rampitsch és mtsai (2006) végeztek a *P. triticina* közel összes rasszára érzékeny Thatcher és egy

ezzel közel izogén, *Lr1* rezisztenciagént hordozó vonalán proteomikai analízist - egy-egy olyan rozsda-rassz fertőzése kapcsán, amely a Tc-vel szemben virulens, míg az Lr1/Tc esetében avirulens módon viselkedik.

Rampitsch és mtsai (2006) a fogékony Tc fertőzése után 7 búzafehérje indukcióját mutatták ki, melyek egyrésze a fehérje-turnoverben játszik szerepet. Közéjük sorolhatók az eIF-5A2 iniciációs és eEF1β elongációs faktorok, melyek indukciója a biotróf gombafertőzés korai stádiumában már dokumentált, megnövekvő protein szintézisre utal (Bushnell 1984, Harrison 1999). A fehérje lebontásban közreműködő foszfoészteráz ill. protein-hidroláz funkciójú fehérjék azonosítása, valamint a lebontásban nélkülözhetetlen 20S proteaszóma α1 alegység megjelenése jól korrelál a cryptogein gomba elicitorral kezelt dohány sejtekben nyert eredményekkel (Suty et al. 2003). A Tcben előbbiek mellett egy trióz-foszfát izomeráz is indukálódott, ami a szénhidrát anyagcserében történő mobilizálódást feltételez, valamint egy, több abiotikus és biotikus stresszfolyamat jelátvitelében (Roberts et al. 2002) résztvevő, számos interakcióra képes 14-3-3 protein és egy nukleinsav-kötő fehérje homológ, amelyek a stresszhez kapcsolódó jelátviteli változásokra utalhatnak. Érdekesség ugyanakkor, hogy a nevezett genotípus teljes levélkivonatára alapozott 2D-PAGE fehérjemintázatában nem sikerült azonosítaniuk az előzőleg már több gabonaféle gombafertőzésre adott válaszában is jellemzőnek talált PR fehérjéket (pl. rizs - Magnaporthe grisea, Kim et al. 2003, 2004), így például 1,3-glükanázokat vagy kitinázokat. Meglepő az is, hogy a Tc-ben fertőzéssel összefüggésben dokumentált fehérjék többsége (32-ből legalább 22) nem növényi, hanem gomba eredetűnek bizonyult.

A Lukács illetve Rampitsch (2006) és mtsai által végzett összehasonlító proteomikai analízisek közös sajátossága, hogy a teljes levélkivonatok 2D-PAGE fehérjemintázataira alapozva sem Lukács (7 dpi), sem pedig Rampitsch és mtsai (9 dpi) nem tudtak reprodukálható különbségeket dokumentálni a Tc-ben megnyilvánuló kompatibilis, és az Lr1 vonalban kialakuló inkompatibilis kapcsolat között. Úgy tűnik, hogy a totál kivonatok vizsgálata nem alkalmas a rozsda meghatározott rasszaival szemben hatékony stresszválasz-típusok illetve rezisztenciaformák közti különbségtételre, és a lehetséges gazdanövények közti különbségek feltárásához kisebb és specifikusabb szövetrégiók proteomikai analízisét célszerű elvégezni. Ebben pedig az elsődleges védelmi vonalként is számon tartott apoplaszt analízise – a korai módszertani hiányosságok ellenére - továbbra is előkelő helyet foglalhat el, amelyet Lukács munkacsoportjának későbbi eredményei (Pós et al. 2005) szintén alátámasztani látszanak.

A patogenezisben ill. a növényi válaszreakciókban érintett anyagcserefolyamatok nagyobb körének feltérképezésében jelentős áttörést hozott, hogy 2007-ben Fofana és mtsai cDNS microarray elemzést publikáltak az *Lr1* gént hordozó Thatcher vonal kompatibilis és inkompatibilis levélrozsda

kölcsönhatásra megváltozott expressziójáról, a fertőzést követő 0-24 órás intervallumot négy része (3, 6, 12, 24 hpi) osztva, 7728 búza EST felhasználásával. Ennek alapján összesen 192 gén esetében sikerült igazolniuk az avirulens és a virulens kórokozóra adott válaszban szignifikánsan eltérő expressziós mintázatot, melyek közt a fotoszintézisben, a reaktív oxigén-formák szintézisében, az ubiquitinálásban, a jelátvitelben és a sikimisav/fenil-propanoid útvonalban szerepet játszó gének találtattak. Joggal feltételezhető, hogy az érintett gének közül több közvetlenül is részt vesz a gazdanövény avirulens kórokozó elleni, koordinált védekezésében. Bár az *Lr1* gén maga nem volt jelen a cDNS array-en, a különbözőképpen regulált gének közül három maga is LRR domént hordozó génterméket kódolt, s közülük kettő ezen belül az NBS-LRR osztály tagjának bizonyult.

Huang és mtsai (2008) Lr34/Tc vs. Tc búzafajta levélrozsdafertőzésre adott válaszának összevetésére létrehoztak egy szupressziós szubtraktív hibridizációs (SSH) cDNS könytárat, melyből egyelőre egy szignalizációban közreműködő fehérjét (MAPK kötő és foszforilációs domén domént is hordozó, RLK-kötő fehérjével homológ), és egy sebzés indukálta proteináz-inhibitort azonosítottak. Egy egészen új, 2009 őszén publikált eredmény, hogy Lasota és mtsai a levélrozsda-fertőzőtt Lr9/Tc vonalra is specifikus szubtraktív SSH cDNS könyvtárat alkottak meg (forward: 357 klón, reverse: 436 klón), és a forward könyvtárból 115 klón szekvenálásával 77 olyan fehérjetranszkriptumot sikerült azonosítaniuk, amelyek jelentős része a patogénfertőzéssel asszociált növényi védekezés ismert vagy feltételezett szereplője.

Bár a transzkriptomikai megközelítések, pl. a nagy sűrűségű cDNS-filterek, cDNS-microarray-ek vagy DNS-chipek alkalmazása nagyon hasznos segítséget nyújtanak egy átfogó kép kialakításához, eredményeik csak a proteomikai adatokkal komplementer módon hasznosíthatók, hiszen a fehérjék mennyisége, aktivitása és mRNS szintjük között gyakran nincs egyértelmű megfeleltethetőség.

#### 2.1.2 A KADMIUM-STRESSZ

Kísérleteim során abiotikus stresszfaktorként a tanszékünkön korábban intenzíven vizsgált kadmiumot használtam. A nehézfém-szennyezés a világ flóráját és faunáját egyaránt veszélyeztető, globális környezeti problémának tekinthető. Ezen belül a kadmium, mint a növények számára az egyik legkönnyebben felvehető és transzportálódó (Kovalchuk *et al.* 2005), s így a táplálékláncba is nehézségek nélkül bekerülő és akkumulálódó nehézfém, különlegesen kockázati tényezőt képvisel.

Az emberi szervezetben bizonyítottan rákkeltő hatása mellett jelenléte számos szervben közvetlen károsodáshoz is vezet (World Bank Group 1998, McLaughlin *et al.* 1999). Célszervei a máj, a vese, a méhlepény, a tüdő, a szív, az agy illetve a csont- és ízületi rendszer is (Buchet *et al.* 

1990, ICdA 2009). Az akut mérgezés tünetei közé sorolják az émelygést, a hányást, a tüdőgyulladást imitáló- tüneteket és hasi rendellenességeket, működési zavarokat, míg a krónikus, hosszabb távú kitettség vérszegénységet, magas vérnyomást, vese- és májműködési zavarokat, leállást, ízületi fájdalmakat okoz, és csontlágyuláshoz vagy spontán csonttöréshez, némely esetben pedig halálhoz is vezethet.

Habár az emberi szervezetben azonos mennyiségű kadmium felszívódása a belégzéshez kötődően egyértelműen hatékonyabb (15-50 %; - ld. kipufogógáz, cigarettafüst), mint a gyomorbéltraktuson át zajló abszorbeálódással (2-7 %), összességében a humán népesség mégis élelmiszerek útján veszi magához kadmiumterhelésének legjelentősebb hányadát (Van Assche 1998). Az akkumulálódó kadmium 98 %-a szárazföldi élelmiszernövényekből, ill. a növényi takarmányon élő háziállatok húsából származik, és csak 1-1 % tudható be a tengeri és édesvízi élőlényeknek ill. az ivóvíz-fogyasztásnak (Van Assche 1998).

### 2.1.2.1 Növényi toxicitás és védekezési stratégiák

A legtöbb pro- és eukariótára nézve toxikus kadmium szerteágazó hatásainak hátterében több tényező áll (4. ábra). A molekuláris alapot egyrészt az adja, hogy ionja igen nagy affinitással kötődik a szulfhidril- és foszfát-csoportokhoz, miáltal számos fehérje megfelelő térszerkezetének kialakítását, s így működését lehetetleníti el, és a redoxi szabályzások közvetett megzavarásához vezethet (Schützendübel és Polle 2002; Hall 2002). A toxicitás másrészt abból eredeztethető, hogy a Cd<sup>2+</sup> jelentős kémiai hasonlóságot mutat több, szintén kétértékű, de esszenciális fémionnal (pl. Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), melyek kulcsfontosságú kötőhelyeiért versengve, pl. enzimek aktív helyébe illeszkedve, specifikusan is interferálhat egyes anyagcsere-folyamatokkal (Roth *et al.* 2006). Az így felszabaduló fémionok ráadásul általános oxidatív károsodást is előidézhetnek a szabad vas/réz-katalizálta Fenton-reakció beindításával (Polle és Schützendübel 2003). A sors fintora, hogy a génexpressziót szabályzó jelátviteli folyamatok a kapcsolódó iontranszport, redoxi szabályzás, Ca<sup>2+</sup>-függő szignalizációs komponensek, és Zn<sup>2+</sup>-ujjú transzkripciós faktorok károsodása okán több szempontból is érintettek (Ghelis *et al.* 2000, Perfus-Barbeoch *et al.* 2002, Sanitá di Toppi és Gabbrielli 1999).



4. ábra: A nehézfémstressz növényi anyagcserét érintő, általános következményei érzékeny növényekben és az akár toleranciát is biztosító stresszkezelés lehetséges stratégiái. Általánosságban a nehézfémionok, gyakran más molekulákkal versengve kötödnek tiol-, karboxil- vagy hisztidil-maradékokhoz, mely által megváltoztatják a célfehérjék eredendő funkcióit, s így a sejt anyagcseréjében káros változásokat idéznek elő, illetőleg olyan jeláviteli útvonalakat is beindíthatnak, amely a szervezet akklimációját készítik elő. Az alkalmazkodás – a nehézfém hatáshelyeinek számos pontján jelentkező, különböző visszacsatolási hurkokon át – pl. a károsodott makromolekulák kijavításához, az antioxidáns rendszer megerősítéséhez vezetnek, és csökkentik a nehézfém koncentrációját a citoplazmás térrészben. A Cd<sup>2+</sup> a nem redox-aktív, de közvetve szintén oxidatív károsodást okozó nehézfémionok közé tartozik. (*Forrás*: Sharma és Dietz 2008)

A kadmium növényekben több alapvető anyagcsere folyamatot is károsít, pl. membrán- és sejten belüli transzportfolyamatokat, a redoxi homeosztázist, fotoszintézist, légzést, valamint a N- és S-anyagcserét (Fodor 2003). A gyökérben főként egyes tápelemek (Ca, Mg, P, K, Fe ill. N) ionos formáinak abszorpciója és transzportja, ill. a víz felszívódása szenved zavart (Alcantara *et al.* 1994, Sanitá di Toppi és Gabbrielli 1999). A kadmium a nitrit- és nitrát-reduktázon és a GS-GOGAT- rendszeren keresztül a nitrogén asszimilációra, továbbá a metabolit-transzportra és a gátolt APS és Cys képződés révén a kén-anyagcserére is kihat (Chaffei *et al.* 2004, Astolfi *et al.* 2004). A fotoszintézis hatékonyságát párhuzamosan több vonalon is veszélyezteti, így a klorofill- és karotinoid-bioszintézis, a fotoszintetikus elektrontranszport lánc több tagja (LHC II, PS-ek stb.) és a sötétszakasz (pl. RuBisCO) is sérülhet (Prasad 1995a,b, Sanitá di Toppi és Gabbrielli 1999). Előbbihez kapcsolódva, a sztóma-zárósejtek vízállapottól független zárásával és a transzspiráció megzavarásával a kadmium dehidratálódást is előidéz a növényben (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002). Az előbb taglalt kórfolyamatokat az 5.A ábra szemlélteti.

A kadmium másodlagos, oxidatív stresszt kiváltó képessége jórészt a szabadgyökök és egyéb aktív oxigén fajták generálásán alapszik, melyet a ROS egyik fő forrásaként is számon tartott fotoszintézis és a légzés agresszív megbolygatása egyértelműen elősegít (Romero-Puertas *et al.* 

2004; Silverberg 1976). A képződő reaktív intermedierek a későbbiekben lipidperoxidációt, fehérjekarbonilálást és enzim inaktiválódást, pigment-degradációt és membránkárosodást váltanak ki, és egyes védekezéssel összefüggő jelátviteli folyamatokra is befolyással bírnak (Romero-Puertas et al. 2001, DalCorso et al. 2008). Nukleinsavakkal bekövetkező reakciójuk kromoszómakárosodást és a sejtciklus megzavarását okozhatja, így a sejt életképességét is veszélyeztetheti (Benavides et al. 2005). A kadmium legjellemzőbb szervi tüneteiként a gyökér idő előtti vastagodását és megnyúlási zónájának rövidülését, valamint gyarapodó gyökérszőrfejlesztés melletti, csökkent oldalgyökérképzését, a hajtásban pedig levélpöndörödést és klorotikus hervadást figyelhetünk meg (Chaffei et al. 2004, Clemens 2006, Durčeková et al. 2007). Mindez végső soron a teljes növény szintjén mérsékelt növekedés, valamint csökkent biomassza termelés és szaporodóképesség formájában jelentkezik (Ernst et al. 2008).

A kadmiummal szemben mutatkozó védekezés az elkerülés, a rezisztencia, illetve a tolerancia különféle formáiként jelentkezik (Clemens 2006b; ld. 5.B ábra), de ha a sejtnedvben a szabad Cd<sup>2+</sup> koncentrációja a 3-10 mg/kg száraztömeg értéket meghaladja, elkerülhetetlenül bekövetkezik az élettani károsodás (Bahlsberg-Pahlsson 1989). A nehézfémek felvétele, szállítása és felhalmozódása meglehetősen komplex folyamat, ami a sejten kívüli kicsapást, extra- és intracelluláris fémion–kelációt, kompartmentalizációt és a szállító edénynyaláb-rendszeren keresztüli transzlokálódásukat is magába foglalja.

A kadmium kitettség során a növényi sejtekben különféle méregtelenítési folyamatok aktiválódnak, amelyek aktív és/vagy passzív védelemet biztosítanak. A kadmium a sejten kívül egyrészt a rizoszférába kiválasztott gyökér exudátum szerves sav, főleg malát és citrát tartalma, másrészt pedig egyes sejtfalkomponensek (pl. savas pektátok és hisztidil csoportok) és más extracelluláris szénhidrátok (pl. nyálka, kallóz) révén immobilizálódhat (Delhaize és Ryan 1995). A talaj és a sejtfal fizikai adszorpciós kapacitását meghaladó koncentráció azonban óhatatlanul a sejtbe irányuló transzporthoz vezet, mivel a Ca<sup>2+</sup>-csatornák és a gyenge szelektivitást mutató, importáló metál-transzporter fehérjék miatt (pl. ZIP, és NRAMP család) a plazmamembránon keresztüli kizárás hatékonysága elenyésző (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002, Krämer *et al.* 2007, Nevo és Nelson 2006).



5. ábra: A kadmiumstressz biokémiai háttere. A.) Kadmiummal asszociált kórfolyamatok hatáspontjai a hajtás szöveteiben és a gyökérben. A kadmium fotoszintetizáló sejtekben, még nem azonosított fémion-transzporterek általi felvételét követően főként a kén-anyagcsere (1.) és a fotoszintézis ill. klorofill-bioszintézis (2.) gátlását idézi elő. Emellett, a sztómazárósejtekben a Ca<sup>2+</sup>-szignált imitálva nyitásra készteti a sejtmembrán anion- és K<sup>+</sup><sub>out</sub>-csatornáit (3.), ami közvetve víz- és turgorvesztéshez vezet, és a gázcserenyílások záródását vonja maga után. A gyökérsejtekben a nitrogén asszimiláció (nitrát- és nitritreduktáz) enzimei érintettek a Cd<sup>2+</sup>-indukált gátlásban, továbbá az NH4<sup>+</sup>-asszimiláció GS-GOGAT rendszere. B.) A kadmiumra adott stresszválasz típusai és színterei. Egyes, adszorbeáló sejtfal-elemek a Cd<sup>2+</sup> extracelluláris immobilizálásával akadályozzák a nehézfém sejtnedvbe jutását. A sejtbe jutó Cd<sup>2+</sup> különféle stresszfehérjék kifejeződését, ill. fitokelatinok és vélhetően metallotioneinek szintézisét is serkenti. Utóbbiak komplexálják az iont és vakuólumba transzportálják a tonoplaszt ABC transzporterein át, ahol a kadmium-ionok kis molekulatömegű komplexeikből, újabb molekulák bekapcsolódásával nagyobb komplex-formákba rendeződnek. A képződő reaktív oxigénformák az antioxidáns rendszer aktiválódását is beindítják, melynek egy jelentős színtere a peroxiszóma.

ABA: abszcizinsav; ABC: ATP-kötő kazetta transzporter; APS: adenilil-szulfát; APX: aszkorbát-peroxidáz; CAT: kataláz; DAG: diacil-glicerol; DHAR: dehidro-aszkorbát-reduktáz; γ-ECS: gamma-glutamil-ciszteinszintetáz; G: G-fehérje; GOGAT: glutamát szintáz; GR: glutation-reduktáz; G(SH-)S: glutation-szintáz, GS: glutamin-szintáz; IP<sub>3</sub>: inozitol-3-foszfát; LHCII: fénybegyűjtő komplex (II); LMW / HMW: kis / nagymolekulatömegű; MT: metallothionein; OAcSer-S: O-acetil-szerin szulfuriláz; PCs: fitokelatinok; PCS: fitokelatin-szintáz; PLP: foszfolipáz protein; PSI és II: fotorendszerek; ROS: reaktív oxigénformák; SOD: szuperoxid-diszmutáz (*Forrás:* DalCorso *et al.* 2008) A citoszólban megjelenő kadmium eltávolítása, illetve semlegesítése ezt követően több útvonalon történhet. A legközvetlenebb út az ion visszapumpálása az apoplasztba, ill. xilem- vagy floemáramlásba juttatása, a sejten belül pedig a vakuólumba történő kompartmentalizációja. Ezt az ionok tekintetében jóval szelektívebb, és gyakran ATP-igényes efflux fehérjék, pl. a HMA, a CDF és az ABC transzporter családok bizonyos képviselői közvetítik (Verret *et al.* 2004; Montanini 2006; Kim *et al.* 2007). A fémionok szeparációja és továbbítása azonban legtöbbször nem csupasz formában, hanem valamiféle ligandummal képzett komplex formájában megy végbe, így SH-tartalmú kelátor peptidek (fitokelatinok – PC, glutation – GSH) és egyes esetekben kis molekulatömegű fehérjék (metallothioneinek – MT) közreműködésével (Cobbett 2000, Cobbett és Goldsbrought 2002, Clemens 2006a).

A kadmium, más abiotikus stresszekhez hasonlóan maga is kiválthatja egyes stresszfehérjék, így hősokk-fehérjék, speciális szerepű aminosavak (pl. prolin), valamint stresszszignálok (pl. szalicilsav, abszcizinsav, etilén) szintézisét, és a szekunder oxidatív stressz következményeként, annak mintegy ellensúlyozására az antioxidáns enzimrendszer számos tagjának (pl. SOD, POD, CAT, APX) - inaktiválást követő - expresszióját (Timperio *et al.* 2008, Fuhrer 1982, Pál *et al.* 2006, Stroiňski 1999, Romero-Puertas *et al.* 2007). Megfigyelték, hogy hosszabb távú, ill. magas Cdkoncentrációnál végzett kezelés idővel paradicsomban és búzában is SOD aktivitásnövekedést indukált, a kezdeti, ROS-kapcsolt aktivitáscsökkenés kompenzálására (Dong *et al.* 2006, Lin *et al.* 2007). Borsóban egy kataláz transzkriptum menyiségi gyarapodásáról, búzában pedig a peroxiszómában lokalizált aszkorbát-glutation rendszer glutation reduktázának (GR) szervfüggő indukciójáról is beszámoltak (Romero-Puertas *et al.* 2007, Yannarelli *et al.* 2007).

A transzkripciós aktiválás azonban nemcsak a méregtelenítésben közvetlenebb szerepet játszó fehérjéket érintheti. A normál élettani aktivitás fenntartásához szükséges, alapvető metabolitokat szintetizáló enzimek expressziós változására jó példa, hogy a N-asszimilációban közreműködő glutamin-szintáz Cd-érzékeny, kloroplasztiszos formájának gátlását kompenzálandó, a hajtásban egy citoszólikus forma expressziójának növekedését észlelték paradicsomban (Chaffei *et al.* 2004).

### 2.1.2.2 Nehézfémstressz hatása a globális fehérjemintázatra

A nehézfém-stresszre specifikus, transzkriptomikai szinten rendelkezésre álló EST könyvtárak és microarray eredmények mellett (pl. Didierjean *et al.* 1996, Fusco *et al.* 2005, Kovalchuk *et al.* 2005), az utóbbi években a fémionok hatásainak szervekre szűkített (pl. gyökér, levél) proteomikai analízisei is megindultak. Az eljárást már többek közt a réz (*A. thaliana* - Smith *et al.* 2004), az arzén (*Z. mays* - Requejo és Tena 2005), a mangán (*V. unguiculata* - Fecht-Christoffers *et al.* 2003a,b), az ólom (*H. annuus* - Walliwalagedara *et al.* 2010) és a kadmium stressz (Repetto *et al.* 

2004, Roth *et al.* 2006, Sarry *et al.* 2006, Aina *et al.* 2007; Ashan *et al.* 2007, Kieffer *et al.* 2008, 2009, Ge *et al.* 2009, Semane *et al.* 2010) hatásvizsgálatára is alkalmazzák.

Sarry és mtsai (2006), a Cd-stresszre adott korai válasz összefüggésében a szén-, kén- és nitrogénanyagcsere komplex aktivációját valószínűsítik többféle kadmium koncentrációjú táptalajon nevelt Arabidopsis sejtkultúrák proteomikai vizsgálata alapján. Roth és mtsai (2006) Arabidopsis csíranövényein alkalmaztak rövid idejű, kis koncentrációjú kadmium-kezelést (10  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>), majd a gyökérre koncentrálva végeztek átfogó proteoma-analízist Western-blot és affinitás-kromatográfiai megerősítéssel. A több ezer, széles kémhatás-tartományban elválasztott gyökér eredetű fehérjéből 41 folt intenzitásának megváltozását észlelték, s ebből 25-öt elemezve 17 fehérjét azonosítottak, melyek legtöbbje 4 osztályba volt sorolható: (1) metabolikus enzimek (pl. ATP-szulfuriláz, glicinhidroximetil-transzferáz, trehalóz-6-foszfatáz); (2) méregtelenítő szerepű glutation-S-transzferázok, (3) latex allergén jellegű fehérjék; (4) ismeretlen funkciójú proteinek. Emellett a gyökérben fitokelatinok (PC<sub>2</sub>) intenzív szintézisét is bizonyították. Előbbi munka mintegy kiegészítéseként, Semane és mtsai (2010) Arabidopsis csíranövények levelén végeztek proteomikai analízist egy hasonlóan enyhe (1-10  $\mu$ M), a környezeti terhelésnek jobban megfeleltethető Cd<sup>2+</sup>-kezelést követően, melynek során, a tolerancia szintjét meghaladó koncentrációnál 21 fehérje szignifikáns erősödését detektálták a fokozott lipidperoxidációban is tükröződő stresszválasz hatására. Munkájuk értékes hozadéka, hogy egy sejtszintű modellt is felállítottak az oxidatív stresszválaszban, a fotoszintézis és energiatermelés folyamataiban, a fehérje-anyagcserében, a génexpresszió szabályzásában, valamint egyéb illetve ismeretlen folyamatokban résztvevő proteinek részvételével.

A modellnövény analízisét rövidesen a fásszárúak tesztelése követte. Kieffer és mtsai (2008) Cd-kezelt nyárfákban, proteoma és metabolit szinten a primer szénhidrát-metabolizmus jelentős átalakulását tapasztalták. Bár a fotoszintézis csak csekély mértékben volt érintett, a csökkent növekedés miatt a képződő fotoasszimilátumok inkább hexózok vagy összetett cukrok formájában raktározódtak, s így ozmoprotektánsként is szerepelhettek a járulékos dehidrációban. A mitokondriális légzésintenzitásban ugyanakkor, a raktározott cukrokkal párhuzamosan növekedést tapasztaltak. Későbbi, 2009-es munkájukban rövid (14 napos) és hosszabb távú (56 napos) kezelésben, szervekre bontva is vizsgálták DIGE-n a Cd-ra adott reakciót. A levelekben egyes stresszfehérjék, pl. hősokk proteinek, proteinázok és PR fehérjék mennyiségének növekedését találták, s a növény-patogén kölcsönhatásból ismert HR-hez jelentősen hasonló válasz indukálódott. A gyökérben jelentősebb volt a kadmium anyagcserére gyakorolt károsító hatása, itt számos tipikus stresszfehérje, pl. a hősokk-fehérjék mellett GST korai, erőteljes indukcióját figyelték meg, míg a primer metabolizmus (pl. glikolízis, Calvin-ciklus, N- és S-anyagcsere) fehérjéinek mennyisége komoly csökkenést mutatott. A glutation-metabolizmus enzimeit tekintve, a glutation-reduktáz és aszkorbát-peroxidáz gátlását a levélben figyelték meg, míg a glutation-S-transzferáz aktivitása (és mennyisége) a gyökérben mutatott emelkedést.

Az élelmezési és takarmányozási szempontból nélkülözhetetlen egyszikűek kadmiumszennyezésre adott válaszának proteomikai elemzése sem sokat váratott magára: Rizs csíranövények totál protein mintázatát érintő változásait átmeneti, tömény (0,2-1 mM) kadmium kezelésre tesztelve Ahsan és mtsai (2007) 21, legalább 1,5-szeres indukciót mutató fehérjét azonosítottak 2D-PAGE-t követő MALDI-TOF eljárással. melyek közt a védekezés és méregtelenítés, antioxidáns és fehérje bioszintézis és csírázási folyamatok szereplői is előfordultak. Szélesebb [Cd<sup>2+</sup>] tartományban (0.1 µM - 1 mM), s a gyökérben vizsgálódva érdekes kettősség is megfigyelhető volt a tiol-peptidek és fehérjék válaszában: míg az alacsonyabb koncentrációnál a Cd<sup>2+</sup> főként a glutation-szint növekedését és védekezési mechanizmusokat aktivált egyes transzporterek és az oxidatív károsodást szenvedett fehérjék lebontásában közreműködő proteinek indukciója révén, addig nagyobb töménységnél a PC<sub>3</sub> fitokelatin-szintézissel együtt inkább egyes szabályzófehérjék és számos metabolikus enzim expressziója volt bizonyítható (Aina et al. 2007). Búza csíranövényeken végzett Cd- és Hg-stressz ill. triklórbenzén (TCB)-kezelés levélre gyakorolt hatását vizsgálva Ge és mtsai (2009) azt találták, hogy mindhárom stresszfaktor vízhiányhoz és protein-foszforilációt is kiváltó lipid-foszforilációhoz vezetett. Míg azonban a  $Hg^{2+}$  a protein szintézist általánosan gátolta a levélben, addig a Cd<sup>2+</sup> és a TCB egyértelműen fehérje indukciót eredményezett. Az indukált proteinek közt a Met-anyagcserében, a RuBisCO módosításában, a protein foszforiláció szabályzásában, a fehérjék megfelelő térszerkezetének védelmében, H<sup>+</sup>transzmembrán-transzportban közreműködő fehérjék, továbbá az etilén stressz-szignált, egyes sejtfalkomponenseket és más, a védekezésben ismert szerepű másodlagos anyagcsereterméket szintetizáló enzimek is szerepeltek.

A növények stressztoleranciájának egy érdekes aspektusa szimbionták lehetséges óvó szerepe a kadmiummérgezés hatásai alól. Repetto és mtsai (2004), Cd-érzékeny borsófajták gyökerén *Glomus* endomikorrhizát fejlesztve azt találták, hogy a kontroll mérgezettekhez képest a nehézfémmel kezelt, de gombával már kolonizált gyökerek növekedésének gátlása egészen visszafogott volt, valamint több, kadmium-függő kifejeződést mutató növényi fehérje is megváltozott expresszióval reagált a szimbionta gombapartner jelenlétéhez köthetően. A *Glomus* fajok arbuszkuláris mikorrhizát képző kolonizációja a gyökérproteoma-mintázat analízise alapján hasonló eredményre vezetett kadmium-kezelt *Medicago*-ban is (Aloui *et al.* 2008). Több *Paxillus* törzzsel kolonizált, füzeken (*Salix × dasyclados*) végzett fitoextrakciós vizsgálatok ugyanakkor azt mutatják, hogy egyes ektomikorrhizát képző gombafajok a nehézfém-ion függvényében is változó előjellel befolyásolhatják a felszívódást és a gazdaszervezeten belüli nehézfémeloszlást. Ren és

mtsai (2006) kadmiummal stresszelt rozson végzett kutatásai pedig arra utalnak, hogy endofiták jelenléte egyes esetekben az akkumulációt is egyértelműen segítheti.

A nehézfém-stresszek kapcsán végzett, egyelőre szerény, szervre specifikált növényi proteomikai analízisek többségét a gyökér- illetve ritkábban a levél totál proteoma analízisek foglalják el. A kadmium indukálta növényi válasz azonban szerv- és szövetszinten nyilvánvaló eltéréseket mutat, mind a károsodás jellege, mind pedig a védekezést szolgáló stratégiák tekintetében. Előbbiekre jó példa a hajtás epidermiszének nekrotikus tünetei a rhizodermis megnövekvő lignifikálódásával szemben, vagy a fitokelatin és szerves sav tartalom, ill. antioxidáns enzimrendszer egyes képviselőinek hajtás és gyökér közti eltérő megoszlása ill. indukálódása árpában (Jócsák *et al.* 2010; Hegedűs *et al.* 2001). Kadmium-kezelt zsázsa csíranövény hipokotilja és sziklevelei, ill. mag és maghéja fehérjemintázatában szintén eltéréseket mutatott (Gianazza *et al.* 2007). Mindezek alapján joggal várható, hogy a különféle sejtkompartimentumok fehérje-mintázatában, beleértve ebbe a sejtközötti álllományt is, eltérések mutatkoznak (Vitória *et al.* 2006).

### 2.1.2.3 Nehézfémek hatása a sejtközötti állományba kiválasztott fehérjékre

A nehézfémekre vagy egyéb, metalloid ionokra adott apoplasztikus válaszban egyelőre az exudátumok metabolit vonatkozása terén rendelkezünk szélesebb ismeretekkel (Guo *et al.* 2007, Horst 2007). Mivel a lignifikálódás, sejtfal-keresztkötések és a reaktív oxigénformák a kadmiumstresszben különös jelentőséggel bírnak (Chen és Kao 1995, Erdeli *et al.* 2004, Metwally *et al.* 2005), ezért a sejtfalhoz eltérő kötődést mutató, savas és bázikus intercelluláris fehérjék közül egyelőre leginkább a reaktív oxigéngyökök előállításában, átalakításában ill. eliminálásukban közreműködő, különféle szubsztrátokra specifikus ill. aspecifikusabb peroxidázok és oxidázok képviselőinek előfordulását, aktivitását és időbeli indukcióját vizsgálják (Fecht-Christoffers *et al.* 2003a, Huttová *et al.* 2006, Tamás *et al.* 2007, Verma *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2009). A témát érintő eddigi munkákat a 4. táblázatban tekintjük át.

A táblázat jól érzékelteti, hogy amíg a nem esszenciális nehézfémek, így a Cd-apoplasztfehérjékre gyakorolt hatását is (pár kivételtől eltekintve) elsősorban a gyökér különböző sejtfalfrakcióinak elemzésén keresztül és főként a redoxi aktivitású enzimfehérjékre koncentrálva végzik jelenleg, addig egyéb, pl. mikroelemként is funkcionáló fémionok (pl. Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) toxicitásának vizsgálatába már a földfeletti szervek (jórészt a levél) intercellulárisait is jobban bevonják (Zhang *et al.* 2008, 2010, Fecht-Christoffers *et al.* 2003a) és az adott ionra érzékeny apoplasztfehérjék vizsgálatában már az átfogóbb, komplex fehérjemintázati változások alkalmas proteomikai metodika is megjelenik (Fecht-Christoffers *et al.* 2003b, Alves *et al.* 2006).

Növényfaj	Kezelés	Lokalizáció	Fehérje	Hatás jellege (+) / (-)	Hivatkozás
árpa ( <i>H. vulgare</i> ) cv. Jubilant	[Cd <sup>2+</sup> ]	gyökér apoplaszt I-V. frakció	peroxidáz (POD) izoenzimek	gátlás (I-IV) és aktivitásnövekedés többféle savas és bázikus izoformán (V, I, II, III)	Huttová <i>et al.</i> 2006
árpa ( <i>H. vulgare</i> ) cv. Jubilant	[Cd <sup>2+</sup> ] 0-2 mM	gyökér apoplaszt I-IV. frakció	aszkorbát-oxidáz (AO) izoenzimek	gátlás >> aktiválás savas és bázikus izoformák (II-III)	Tamás <i>et al.</i> 2006
árpa ( <i>H. vulgare</i> ) cv. Jubilant	[Cd <sup>2+</sup> ] ill. egyéb abiotikus stresszorok	gyökér apoplaszt, sejtfal és intracelluláris frakciók	peroxidáz (POD) izoenzimek	egy bázikus POD (pl ~9) erőteljes indukciója a gyökércsúcsban, más izoformák inhibíciója	Tamás <i>et al.</i> 2007
mustár ( <i>B. juncea</i> ) cv. Varuna	[Cd²+] 0-200 μM	gyökér apoplaszt	peroxidáz (POD) izoenzimek	ionosan kötött: (+) oldékony típus: (-)	Verma <i>et al.</i> 2008
mungóbab (Phaseolus aureus) és lóbab (Vicia faba)	[Cd²+] 100 µM	levél apoplaszt vs. szimplaszt	SOD APX POD (NADPH oxidáz)	kontroll aktivitás és indukcióbeli eltérések az eltérő toleranciájú fajokban	Zhang <i>et al.</i> 2009
szója (G. max)	[Al <sup>3+</sup> ]	gyökércsúcs	egy 97 kDa protein	csökkenő mobilitás	Kataoka <i>et al.</i> 2003
vegyes erdei flóra	[Al <sup>3+</sup> ]	rizoszféra, talajoldat	8 féle szén- mineralizáló enzim	precipitáció	Scheel et al. 2008
szálkamenta (Elsholtzia haichowensis)	[Cu²+] 100 μΜ	gyökér és levél apoplaszt vs. szimplaszt	CAT, SOD APX (G)POD (NADPH oxidáz)	Cu-Zn SOD és GPOD indukciója	Zhang <i>et al.</i> 2008, 2010
spenót ( <i>S. oleacea</i> )	[Ag+], [Hg <sup>2+</sup> ], [Cu <sup>2+</sup> ]	levél apoplaszt	2-2 savas pH opt.ú galaktozidáz és arabinofuranozidáz	gátlás	Hirano <i>et al.</i> 1994
szója (G. max)	[Al <sup>3+</sup> ]	gyökércsúcs	egy 97 kDa protein	csökkenő mobilitás	Kataoka <i>et al.</i> 2003
erdei flóra	[Al <sup>3+</sup> ]	rizoszféra, talajoldat	8 féle szén- mineralizáló enzim	precipitáció	Scheel et al. 2008
tehénborsó ( <i>V. unguiculata</i> ) cv. TVu 91 / 1987 (érzékeny és toleráns)	[Mn²+]	levél apoplaszt	izoenzimek: peroxidáz (POD) GR MDHAR	erőteljesebb aktiválódás: - szenzitív vonalban - szenzitív vonalban - mindkét vonalban	Fecht- Christoffers <i>et</i> <i>al</i> . 2003a
tehénborsó ( <i>V. unguiculata</i> )	[Mn <sup>2+</sup> ]	levél apoplaszt	peroxidázok (PR9) PR1, PR2, PR3, PR5	indukálódás	Fecht- Christoffers <i>et</i> <i>al.</i> 2003b
csillagfürt ( <i>L. albus</i> )	B-hiány	levél apoplaszt	PR1, PR2, PR5, PR8, expanzinszerű fehérie	indukálódás	Alves <i>et al.</i> 2006

# 4. táblázat: A nehézfém- vagy metalloidstressz kapcsán ezidáig publikált, megváltozott expressziót ill. aktivitást mutató apoplaszt-fehérjék analíziseinek áttekintése (részleteket ld. a szövegben).

Huttová és mtsai (2006) az árpa gyökér sejtfalának fehérjéit az egyre gyengülő kötőerő szerint öt (I-V) frakcióra bontva, peroxidáz (POD) izoenzimek aktivitása és 1D-fehérjemintázata szintjén vizsgálták a kadmium-stressz hatását,. Az aktivitás-assay-ek erős (I), majd egyre gyengülő gátlást mutattak (II-IV) a sejtfaltól távolodva, az V., gyenge kötődésű frakcióban viszont ezzel egyidőben intenzív aktivitásnövekedés volt tapasztalható. A savas és lúgos, natív PAGE-hez kötött gélekben végzett gvajakol-peroxidáz assay-ek révén ugyanakkor, még a gátolt aktivitású régiókban is izoperoxidázok megnövekvő aktivitását lehetett megfigyelni: (I): egy savas izoenzim gátlása mellett két bázikus izoforma aktiválása; (II és III): további két bázikus és egy savas POX aktiválása; (V): erősen aktiválódó bázikus izoforma jelenlétét tapasztalták.

Az előbbi munkacsoportban vizsgálták továbbá az apoplasztikus és sejtfali aszkorbát-oxidáz (AO) enzimek különféle izoformáinak aktivitásváltozását is az I-IV. (extracelluláris, oldékony, sejtfal- és membránkötött) frakciókban (Tamás *et al.* 2006). A normál körülmények közt a II. frakcióban leginkább aktív enzimtípust a magas Cd-koncentráció minden frakcióban gátolta, de két savas és két bázikus izoenzim csökkent aktivitása mellett egy újabb, bázikus izoforma aktivitása vált kimutathatóvá (II. és III. frakciók). Mivel az AO enzimeket – a plazmamembrán elektrontranszportban, a sejtmegnyúlásban, a sejtfal anyagcserében és az oxigén-elérhetőség szabályzásában végzett szerepük miatt – a növekedés egyik kulcsenzimeiként tartják számon, valószínű, hogy az árpa gyökerének kadmium okozta csökkent gyarapodásában erőteljes szerepe lehet egyes apoplasztikus aszkorbát-oxidáz izoenzimek gátlásának (Tamás *et al.* 2006).

Mustár csíranövények és 3-4 leveles állapotú egyedek kadmiumterhelését vizsgálva, szintén eltérésekről számoltak be a különböző kötődésű gyökér sejtfal fehérjefrakciók aktivitása terén Verma és mtsai (2008). Megfigyeléseik szerint az ionosan kötött POD-ok enzimaktivitása, a emelkedő kadmium- (és réz-) koncentrációval párhuzamosan növekvő  $H_2O_2$  szintjével közvetlen pozitív korrelációt mutatott, a szolubilis POD frakcióban azonban, bár csak a csíranövények szintjén, csökkent aktivitás volt megfigyelhető (50-100  $\mu$ M).

Tamás (2007) továbbá, összehasonlító jelleggel is vizsgálta a peroxidázok aktivitását különféle abiotikus stresszorokkal (Al, Co, Cu, Hg; szárazság, só, hő és hideg), továbbá POD aktiváló (2,4-D) vagy gátló (SHAM), ill. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal vagy peroxidnyelő (DTT) komponensekkel kezelt árpagyökerek apoplasztjának összevetésével. A bázikus peroxidázok között, kadmium stresszre specifikusan egy csak a gyökércsúcsban szekretálódó peroxidáz izoforma (pI ~9) kifejeződését igazolta, míg ezzel egyidejűleg további izoformák aktivitásában a nehézfém jelenlétével összefüggésben csökkenést tapasztalt. A Tamás és mtsai (2007) által vizsgált bázikus peroxidázok lokalizációjának elemzése ugyanakkor, savas peroxidázokkal végzett korábbi vizsgálatokhoz (Ros Barceló *et al.* 1989) hasonlóan arra hívja fel a figyelmet, hogy egy-egy izoforma jelenléte akár több apoplasztfrakcióra is kiterjedhet. Mivel pedig a sejtmegnyúlás folyamatát vizsgáló, utóbbi munkából az is bizonyíthatóvá vált, hogy egy-egy izoforma apoplasztfrakciók közti *megoszlására* is hatást gyakorolhat a növény élettani állapota (Ros Barceló *et al.* 1989), az is feltételezhető, hogy nemcsak normál differenciációs folyamatok, hanem egyes stresszhatások (köztük nehézfémek) is képesek ily módon (is) szabályozni az extracelluláris tér redox folyamatait.

A peroxidáz aktivitásvizsgálatok során kadmium kezelt gyökérmintákban is gyakran léptek fel látszólagos anomáliák, amikor kezelés, növényfaj, sőt akár kivonási mód vagy aktivitás assay függvényében egyes esetekben aktivitásnövekedést (Chen és Kao 1995; Schützendübel *et al.* 2001, Chaoui *et al.* 2004; Erdeli *et al.* 2004; Metwally *et al.* 2005; Singh *et al.* 2006), máskor gátlást (Chen *et al.* 2003, Ranieri *et al.* 2005) figyeltek meg, sőt gyakran semmiféle változás sem volt kimutatható (Chaoui *et al.* 1997, Hegedűs *et al.* 2001, Pál *et al.* 2005). Egyes esetekben a változatlan aktivitásúnak tűnő kivonat *in gel* assay-ben mégis eltéréseket mutatott (Tamás *et al.* 2007). Mindez jól példázza, hogy a nehézfém-stressz kapcsán potenciálisan közreműködő, számos anionos és kationos jellegű, különféle mérettartományba sorolható izoenzim mélyebb tipizálására égető szükség volna (Tamás *et al.* 2007). Meglehetősen széles szubsztrát-specificitásuk, továbbá eltérő aktivitásbeli és expressziós érzékenységük miatt jellemzésük ugyanakkor a szekvenciális azonosítást sem nélkülözheti, emiatt pedig, a fehérje-szintű validáláshoz az itt feltárt peroxidázok körében is elengedhetetlen volna a proteomikai közelítés.

Egyéb fémionok intercelluláris fehérjékre gyakorolt hatásainak vizsgálatában globálisabb, rendszer szintű megközelítést keresve Fecht-Christoffers és mtsai 2003-as, tehénborsó levél apoplasztján végzett újabb proteomikai tanulmánya tekinthető ezidáig a legátfogóbbnak. Míg egy korábbi tanulmányukban a klasszikus vonalat követve POD, GR és aszkorbát regenerálását végző enzimek aktivitását tanulmányoztak a rendszerben (Fecht-Christoffers et al. 2003a), ebben a mangán-mérgezéshez kötődően, több, eltérő indukciójú és specificitású peroxidáz azonosítása mellett, a BN-/SDS-PAGE és IEF/SDS-PAGE gél-alapú elemzésükben azonosított 21 ill. 42 fehérje közt olyan fehérjék jelenlétét is bizonyították, amelyek komoly hasonlóságot mutatnak egyes sebzés-indukálta és más, patogenezissel kapcsolt (PR) fehérjékkel, így pl. glükanázokkal, kitinázokkal, sebzés-indukálta és thaumatinszerű fehérjékkel, valamint a PR1 család képviselőivel. Mivel pedig a kadmium egyéb, esszenciális ionok, köztük a bór felvételét is képes megzavarni, a témában, közvetve említésre méltó az a proteomikai tanulmány is (Alves et al. 2006), amely a Cdstressz esetében is számottevő bórhiány hatását vizsgálta a levél apoplaszt szolubilis fehérjéire. A munka azzal az eredménnyel zárult, hogy az eltérőnek talált 23 fehérjefoltból azonosított 9 protein közt PR1-szerű, béta-1,3-glükanáz, III osztályú kitináz, thaumatin-szerű, és egy expanzin jellegű fehérjét is sikerült azonosítaniuk, amelyek a védekezésben is közismertek. S amíg a legtöbb hasonló expressziót mutatott vízhiány esetében is, egy PR1 fehérje *de novo* expresszálódónak bizonyult.

25

A nehézfém-stresszek egy speciális aspektusa, hogy az apoplaszt fehérjekivonatokban egyes esetekben a fehérjekoncentráció csökkenése vagy növekedése, ill. bizonyos fehérjék hiánya figyelhető meg (Blinda *et al.* 1997, Kataoka *et al.* 2003). Ezzel kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy a jelenség hátterében az egyes szekretált fehérjék mobilitásának vagy expressziós szintjének megváltozása vagy esetleg a proteolitikus aktivitás módosulása áll-e az apoplasztban. A kérdés azért is jogos, mert a Cd-stressz hatására peroxidázok jelennek meg, melyek számos képviselője a sejtfalszerkezet erősítésére (Lagrimini *et al.* 1997), míg mások annak fellazítására képesek (Liszkay *et al.* 2003), valamint ismeretes, hogy kadmium hatására a membrán-integritás is sérülhet (Fodor *et al.* 1995, Tamás *et al.* 2006). Kataoka és mtsai (2003) alumíniummérgezés kapcsán egy nagy molekulatömegű (97 kDa) protein csökkenő mobilitását és a sejfal bizonyos elemeihez való erősebb kötődését bizonyították szója gyökércsúcsban, Scheel és mtsai (2008) pedig további nyolc, a szén mineralizációjában is szerepet játszó (kitináz, cellobiohidroláz, glükozidáz, glükuronidáz, lakkáz és xilozidáz aktivitású) extracelluláris enzim precipitációját észlelték Al<sup>3+</sup> jelenlétében a talajoldatban.

Blinda és mtsai (1997) viszont árpalevélben a Ni-, Zn- és Cd-stressz kapcsán kinyerhető, megnövekedett apoplasztikus fehérjemennyiség elsődleges okát a *de novo* protein-szintézissel magyarázták, nem tulajdonítottak jelentőséget a sejtfalszerkezet megváltozásából eredeztethetően esetleg gátolt immobilizációnak, és nem találtak különbséget a kezelt és a kontroll növények apoplasztjának (amúgy minimális) proteáz aktivitásában sem. Hirano és mtsai (1994) ugyanakkor spenótlevélből két-két olyan, savas pH optimummal rendelkező galaktozidáz és arabinofuranozidáz izoformát izoláltak, melyek aktivitása érdemi nehézfém-érzékenységet mutatott, s amelyek így, gátolt aktivitásuk révén közvetve mégis hozzájárulhatnak a sejtfal rigiditás növekedéséhez.

### 2.2 AZ APOPLASZT

A növény stresszre adott válaszának sokrétűsége nemcsak az egy-egy stresszor által befolyásolt, párhuzamos vagy éppen szekvenciálisan zajló, gyakran egymásra épülő vagy legalábbis egymásra hatást gyakorló anyagcsere-folyamatok sokféleségét rejti az egyedben, hanem azt a tényt is, hogy ezen reakciók nemcsak sejtes, hanem szöveti és szervi tekintetben is változatos színtereken zajlanak a szervezetben. Egy vizsgált növényi régió bizonyos stresszorra való *érzékenysége* (annak adott fokú sebezhetősége mellett) az adott stressz érzékelésének, a jel továbbításának és a válasz során indukálódó, specifikus vagy általánosabb reakcióknak az eltérő lehetőségét is magába foglalja, s egyúttal a hatékony kifejeződés és lezajlás korlátait is meghatározza az adott térrészben.

A növény több szervet is átívelő sejtközötti állománya, amely azonban eredetét tekintve alapvetően a konkrét szövet sejtes állománya által fenntartott és meghatározott, nem egyedül a sejtes állományra jellemző reduktív közeg hiánya vagy pl. az alapvetően eltérő, savasabb kémhatás viszonyok tekintetében képes speciális reakciók helyszínévé válni. Abban az értelemben is egyedinek tekinthető, hogy áramlásviszonyainak speciális, de szabályozott volta révén a különféle folyamatok dinamikus összehangolásában közreműködik a szervek közt. Emellett speciális, perifériás elhelyezkedése révén a külső közeg és a szervezet közti kommunikációban határfelületként is hatékonyan segédkezhet, ezúton is biztosítva a szervezet koordinált működését.

A vizsgálatba vont levélrozsda kórokozója és a kadmium, mint stressztényezők által generált, fehérje szinten mutatkozó stressszválaszokat erre a speciális növényi közegre szűkítve végeztem. Ez indokolja az intercelluláris állomány alábbi, részletesebb bemutatását.

Apoplasztnak nevezzük a növényi szövetek sejten kívüli részét a sejtfallal együtt, míg a plazmamembránon belüli alkotórészeket együttesen a szimplaszthoz soroljuk. Az apoplaszt tehát a sejtfalat, az intercelluláris tereket és egyéb komponenseket magába foglaló, speciális közeg, amelyben érzékeny, dinamikus változások zajlanak a növekedéshez és fejlődéshez, illetve a környezeti alkalmazkodáshoz kötődően (Dietz 1997, Pignocchi és Foyer 2003).

Az apoplaszt a növényi szövetek térfogatának legfeljebb 5 %-át teszi ki a föld feletti szervekben (Steudle *et al.* 1980, Parkhurst 1982) és a gyökérkéregben (Vakhmistrov 1967). Számtalan makromolekula (pl. szénhidrátok, fehérjék, lignin), valamint kisebb szerves és szervetlen komponens és gázok elegye. Anyagtartalmát a xilemből származó import, a sejtek adszorpciója és a floembe továbbított export mindenkori egyensúlya határozza meg (López-Millán *et al.* 2000). A térfogat kicsinysége miatt az áramlásokban bekövetkező, viszonylag csekély módosulás is komoly változásokhoz vezethet az apoplaszt összetételében.

A sejtközötti állomány a szervetlen ionok és szerves metabolitok nagy sokféleségét, így szerves savakat (Gabriel és Kesselmeier 1999), mint pl.aszkorbátot (Polle *et al.* 1990, Luwe *et al.* 1993), aminosavakat és egyéb N-tartalmú komponenseket, hormonokat illetve cukrokat (Hsu *et al.* 1984, Tetlow és Farrar 1993) is tartalmaz. Enzimekben (Li *et al.* 1989, Pinedo *et al.* 1993) és más létfontosságú fehérjékben való viszonylagos gazdagsága alapozza meg sokrétű szerepkörét. Szerepet játszik a növekedési és differenciálódási folyamatokban (Regalado és Ricardo 1996, Dani *et al.* 2005), így a sejt megnyúlásos növekedésében, a sejtadhézióban, sőt a sejtosztódást is befolyásolja (Takeda *et al.* 2003). Emellett a víz és az ásványi tápelemek ill. egyéb kismolekulák és asszimilátumok szállításában (Nielsen és Schjoerring 1998, Chikov és Bakirova 2004, Sattelmacher és Horst 2007), a raktározásban és méregtelenítésben is fontos feladatai vannak (Starrach és Mayer 1989, Wolf *et al.* 1990, Zhang *et al.* 1991, Brune *et al.* 1994). A jelátvitelben betöltött kiemelkedő

szerepét a környezet és a protoplaszt közti speciális, összekötő szerepe biztosítja (Hartung *et al.* 1992, Sakurai 1998).

Különféle környezeti hatásokra az apoplaszt anyagcsere-folyamataiban érzékeny változások következnek be, mely a fehérjemintázat dinamikus megváltozásában is tükröződik. Mint a káros hatások érzékelését végző és azok eliminálásába is bekapcsolódó elsődleges védelmi vonal, a növényi stresszkutatások kiemelt célpontja. Proteomikai analízisét vélhetően mindössze pár száz fehérjét magába foglaló fehérje-sokfélesége jelentősen megkönnyíti. Mivel biotikus és abiotikus stresszvizsgálataimat a levél sejtközötti állományába szekretált szolubilis fehérjefrakció változásaira koncentrálva végeztem, az alábbiakban rövid áttekintést adok az apoplasztban eddig ismert fehérjék változatosságáról és a bizonyítottan, érdemi közreműködésükkel lebonyolított stresszválaszokról.

### 2.2.1 Az apoplaszt proteomikája és stresszválasza

Az apoplaszt protein profiljának megváltozását a környezettel való kölcsönhatás folyományaként számos abiotikus és biotikus stressz tényező indukálhatja (Sattelmacher 2001). Így pl. ozmotikus stressz (Marshall *et al.* 1999), szárazság és sóstressz (Ramanjulu *et al.* 1999 és Zhu *et al.* 2007, Dani *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2009, Guo és Song 2009), nehézfém toxicitás (Fecht-Christoffers *et al.* 2003a,b, Kataoka *et al.* 2003), hidegstressz (Marents *et al.* 1993), valamint sebzés (Li *et al.* 1990), patogén stressz (Il *et al.* 2005, Misas-Villamil és van der Hoorn 2008) vagy herbivorok támadása (Van der Westhuizen és Pretorius 1996, del Carmen Córdoba-Pedregosa *et al.* 2003) kapcsán is kimutatták változásait.

Az apoplasztban potenciálisan előforduló fehérjék száma valójában nehezen felmérhető. Általánosan elfogadott, hogy egy adott élettani állapotban az apoplaszt legfeljebb néhány százféle fehérjét tartalmaz (Lee *et al.* 2004, Wen *et al.* 2007). Az egyre gyarapodó, befejezett genom projektek ennél jóval nagyobb potenciális sokféleségre engednek következtetni. Az *Arabidopsis thaliana* genom ismeretében, 2006-ban nagyságrendileg harmincezer (egészen pontosan 33 809), feltételezhetően szekretált polipeptidet kódoló nyílt leolvasási keretet azonosítottak, melyek közül microarray adatok alapján sok ténylegesen is kifejeződik (Lease és Walker 2006). Más kutatások alapján közel 5000 proteinről feltételezhető, hogy a szekretált fehérjékre jellemző, az endomembrán rendszerben lehasadó N-terminális szignál peptidet hordoz (Bendtsen *et al.* 2004a), s ezek közül kb. 1500-at kifejezetten a sejtfallal asszociált szerepkörben tartanak számon (Bendtsen *et al.* 2004b, de Jong *et al.* 2006, Somerville *et al.* 2004).

A valós nagyságrend felmérésének egyrészt technikai problémák szabnak korlátot. Az intercelluláris fehérjék kinyerésére alkalmazott eljárások mindegyike magában hordozza a profilszűkülés és a kontamináció lehetőségét (Jamet *et al.* 2008, Borderies *et al.* 2003), amely főként a különféle sejtfalkomponensekhez más-más affinitással és kémiai kölcsönhatással kötődő sejtfalproteinek esetében jelent komoly veszélyt (Robertson et al. 1997). Az előbbi problémákat a szeparálásra és azonosításra választott tömegspekrometriai módszerek egyéni lehetőségei és korlátai (pl., erősen bázikus és hidrofób proteinek rossz elválaszthatósága, szűkebb dinamikus felbontás 2D-PAGE-n vs. MudPIT; emésztés, ionizáció és detektálás típusai MS-ben) csak tovább erősítik. A problémák másik oldalát a biológiai információhiány jelenti, amennyiben az átfogó screenelés alapjaként szükséges genomi adatbázisok jelentős szekvenciális és annotációs hiányosságokkal rendelkeznek, illetve az is probléma, hogy az ezekre épülő bioinformatikai eszközök többsége, így a fehérje lokalizációját annak szerkezetéből vagy szekvenciájából levezető, különféle algoritmusokkal dolgozó predikciós programok (pl. TargetP, SignalP - Emanuelsson et al. 2007), vagy a funkcionális hálózatokat építő alkalmazások (pl. AtPID) szintén csak korlátozott, statisztikai biztonságot nyújthatnak (Nielsen et al. 1997, Antelmann et al. 2001).

Az apoplasztban eddig azonosított fehérjék közül eddig csak kevéshez köthető konkrét biológiai funkció, számos esetben viszont az is bizonyított, hogy multifunkciós fehérjék is szekretálódnak (Segarra *et al.* 2003). Emellett, mostanában egyre nő az arra utaló bizonyítékok köre, hogy a növény a különféle fejlődési és egyéb fiziológiai folyamatainak befolyásolására fehérje jellegű, (peptid) szignálokat is felhasznál az apoplasztban (Cock és McCormick 2001, Zhang *et al.* 2009), így pl. a sziszteminnel analóg Hyp-gazdag glükopeptideket (Pearce és Ryan 2003), fitoszulfokineket (Matsubayashi és Sakagami 1996, 2006), a CLAVATA3-t (Trotochaud *et al.* 2000) vagy egy öninkompatibilitásban közreműködő (S-lókusz) Cys-gazdag proteint (Schopfer 1999), így az apoplasztban betölthető fehérje-szerepkörök száma egyre csak bővülni látszik.



6. ábra: A.) Az apoplaszt normál élettani szerepköre az elsődleges sejtfal szintézise ill. átalakítása példáján; B.) A kórfolyamatokkal kapcsolt szekréciós válasz a gombafertőzések példáján. XDP: cukor-nukleotid(ok); GIP: endo-β-1,3-glukanáz inhibitor protein, PGIP: poligalakturonán-inhibitor protein; XGIP: xiloglukán endoglukanáz inhibitor protein (*Forrás:* University of Georgia, Complex Carbohydrate Research Center (CCRC) honlapja - http://www.ccrc.uga.edu/~mao/cellwall/main.htm, http://www.ccrc.uga.edu/~mao/intro/ouline.htm és http://www.ccrc.uga.edu/~mao/plapath/elicitor.gif)

Referencia apoplaszt fehérje-térképezés több fajnál is folyik napjainkban. Haslam és mtsai 2003ban *Arabidopsis thaliana, Oryza sativa* és *T. aestivum* (cv. 'Paragon') fajokban totál levélkivonat és apoplaszt szolubilis frakcióinak összehasonlító 2D-PAGE fehérjemintázatát publikálták, az első két fajra nézve számos fehérje MS-azonosításával is kiegészítve (lúdfűben 25-ből 14 (56 %), míg rizsben 23-ból 9 esetben (39 %) sikerrel). A mintázatok összevetéséből taxon-specifikus eltérések és rokon fajokban mutatkozó hasonlóságok egyaránt bizonyíthatók voltak. A lúdfűben és rizsben azonosított, dominánsabb proteinek közt a fejlődésben (sejtosztódás/sejtmegnyúlás – pl. aszkorbátoxidáz) ill. a patogén elleni védelemben szereplő (germin-szerű proteinek, különféle glükohidrolázok, taumatinszerű proteinek, szubtilizinszerű proteinázok, malát-dehidrogenáz (!)), valamint a szignalizációban (Ser-karboxipeptidáz, Ser/Thr-protein kináz) és a tápelemasszimilálásban (nitrát-reduktáz) közreműködő fehérjéket azonosítottak.

Soares és mtsai 2007-ban közölték a *Medicago truncatula* levél apoplasztjának (2-DE – MALDI-TOF/TOF alapú) fehérjetérképét, amelyben 300-at meghaladó, az intercelluláris folyadékban jelenlévő (220) ill. a sejtfalhoz ionosan kötődő (84) protein reprezentatív jelenlétét bizonyították. *Arabidopsis és Medicago* gyökér apoplasztjának térképezésében, összehasonlító jelleggel a 2-DE, LC-MS/MS és a MudPIT technológia is szerepet kapott (Basu *et al.* 2006) 16 ill. 52 fehérje azonosításával, szignál-peptid hasítóhely ill. transzmembrán domének ill. horgonyok szűkítésével. A funkcionális osztályozásban glikozid-hidrolázok, tripszin/proteáz inhibitorok, plasztocianin-szerű domének, Cu-Zn szuperoxid-diszmutázok, gamma-tioninok (PR12), taumatinok (PR5), ubiquitinek, proteáz inhibitor/mag raktározó/lipid transzfer fehérjék, transzkripciós faktorok(!), III osztályú, szekréciós peroxidázok, és novena bázikus szekréciós fehérjék (BSP) egyaránt szerepeltek.

Rizsben főként a levél és sejtkultúrák szekretált fehérjefrakciójának azonosítása zajlik (Jung *et al.* 2008, Chen *et al.* 2008, Cheu *et al.* 2009). Búza esetében ugyanakkor nem véletlen, hogy MS-sel kombinált proteomikai alapon mindmáig nem született átfogó apoplaszt referenciatérkép, s Haslam és mtsai (2003) számos rizs ill. lúdfű apoplasztfehérje MS-azonosításával szemben *Triticum* esetében még mindig csak mintázat-szintű összevetésre vállalkoztak – annak ellenére, hogy a búza 2D-PAGE alapú referenciatérképezése már a '80-as évek közepén megindult, cv. 'Little Club' fajtán (Holden és Rohringer 1985a,b). Míg azonban akkoriban főként a korai tömegspektrometriai módszerek korlátainak volt köszönhető, hogy a kiváló, szisztematikus munka az elválasztott apoplasztfehérjéket elsősorban csak glükoprotein-jellegük ill. feltételezett peroxidáz és különböző specificitású (arabino-, fuko-, galakto-, N-acetil-galaktózamino-, manno-, xilo- és glüko-sztereoizomereket hasító) glükozidáz enzimaktivitásuk szintjén jellemezhette, mára sokkal inkább
az adatbázis-hiányosságok és a genomi térképezés elhúzódása állják útját egy áfogóbb projektnek, így a megfelelő fajtaválasztás is elengedhetetlen volna a sikerhez.

*Arabidopsis*-ban, a sejtszuszpenziós kultúrákból (Robertson *et al.* 1997, Chivasa *et al.* 2002, Borderies *et al.* 2003, Bayer *et al.* 2006); tőlevélrózsából (Boudart *et al.* 2005); hipokotilból (Feiz *et al.* 2006); virágzó szárból (Minic *et al.* 2007); és sejtfal-regeneráló protoplasztokból (Kwon *et al.* 2005) proteomikailag azonosított extracelluláris fehérjék funkciójuk szerint a következő csoportokba sorolhatók: (1) szénhidrátokon ható fehérjék (glikozil-hidrolázok, észterázok és liázok, expanzinok); (2) oxido-reduktázok (peroxidázok és egyebek); (3) proteázok; (4) kölcsönható doménű fehérjék (szénhidrát- és fehérjekötő típusok); (5) szignalizációban szereplők; (6) sruktúrfehérjék; (7) multifunkciós fehérjék; (8) ismeretlenek (Boudart *et al.* 2007).

Az analízisek egyik fontos üzenete, hogy az egyes fajok rendkívül eltérő, azaz specifikálódásra is lehetőséget adó extracelluláris proteinmintázattal rendelkeznek (Haslam *et al.* 2003, Robertson *et al.* 1997), de az is kiderült, hogy a szövettenyészetben vagy sejtszuszpenzióban nevelt és a természetes szöveti differenciációt mutató szervekből izolált apoplasztfehérjék mintázata között minimális az átfedés (Jung *et al.* 2008). Így, bár a sejtszuszpenziós technológia számos előnnyel rendelkezik a kezelhetőség terén, sőt, különféle hormonális szignálokkal és egyéb elicitorokkal számos differenciálódási program vagy éppen szignáltranszdukciós útvonal indukálható egyszerű módon a tenyészetben, az abban nyert eredmények csak fenntartásokkal és kiegészítő jelleggel hasznosíthatóak.

#### 2.2.2 Apoplaszt proteoma-adatbázisok

A növényi sejtfal proteoma, legalábbis a megszekvenált genomú fajok terén mára olyannyira intenzíven fejlődő kutatási területté vált, hogy *A. thaliana*-ban jelenleg a genomi szekvenciák alapján jósolt, kb. 1500 sejtfalfehérjének kb. 25-30 %-át, azaz közel 4-500 fehérjét sikerült már különféle szervekben ill. eltérő környezeti viszonyokhoz kötődően izolálni és azonosítani (WallProtDB, 2009). A legutóbbi eredmények szerint ez a szám rizsben is a 300-at közelíti (Jung *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008; Chou *et al.* 2009). Ennek megfelelően, az egyes fajokra referenciaként is használható proteomikai adatbázisok ill. különféle stresszekre specifikus apoplaszt gyűjtemények létrehozására számos törekvés indult. 2004-ben, az Alberta Egyetemen (Kanada) Wang és mtsai egy online, a legnagyobb annotált fehérje-adatbázissal (SWISS-PROT/TrEMBL) is összefüggésben álló, extracelluláris növényi protein-adatbázis kiépítésébe kezdtek (*Extracytosolic Plant Proteins Database (EPPdb*), http://eppdb.biology.ualberta.ca), eredetileg *Brassica napus* apoplaszt fehérjéken 2D-PAGE; LC-MS/MS, *de novo* szekvenálás és bioinformatikai források alkalmazásából nyert eredményeik összegzéseként. Jamet és mtsaihoz (2006) kapcsolódóan, a Toulouse-i Egyetemen "*WallProtDB*" néven egy francia sejtfal proteoma-adatbázis látott napvilágot. Az

eredmények interpretálásának elősegítésére utóbbiban a találatok a szubcelluláris lokalizáció és funkcionális domének predikciójára alkalmas *ProtAnnDB* (*Protein <u>Ann</u>otation <u>DataBase</u>) adatbázissal (San Clemente <i>et al.* 2009 - www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/ProtAnnDB/) is kapcsoltak. Jelenlegi *A. thaliana* és *O. sativa* adataik mellett a jövőben tervezik az adatbázis egyéb növényfajokra való kibővítését is.

# 2.3 A FEHÉRJE SZINTŰ STRESSZVÁLASZ

A növényi védekezésben közreműködő fehérjekódoló géneket, termékeik időbelisége szerint feloszthatjuk a korai jelérzékelésben és pl. a hiperszenzitív reakció kialakításában szerepet játszó fehérjék génjeire, a szűkebb értelemben vett szignáltranszdukció szereplőire, és végül a védekezés későbbi fázisában, több lépcsőben indukálódó, effektor funkciójú célgénekre, melyek köre, kifejeződésük és aktivitásuk szabályzása a stresszor típusától függően részlegesen specifikált.

Hangsúlyozni kell ugyanakkor, hogy a válaszreakciók, így a mikrobával asszociált molekuláris mintázat (MAMP) észlelése révén aktiválódó, ősi típusú s gyakran *bazális rezisztenciá*hoz vezető védelem (Klement 2004, Nürnberger és Kemmerling 2009), továbbá a jóval specifikusabb, adott patogén eredetű avirulencia faktorok (Avr) és növényi rezisztencia (*R*) gének kölcsönhatására épülő effektor-indukált védekezés (Chisholm *et al.* 2006) különféle lokális és szisztemikus formái (az obligát- és hemibiotróf kórokozók indukálta hiperszenzitív reakció (HR) és szisztémás szerzett rezisztencia (SAR), a nekrotróf patogének vagy sebzés indukált (WRP) és herbivorok által kiváltott rezisztencia (IRH) s végül az indukált szisztémás rezisztencia (ISR)) - természetükben jelentős átfedéseket mutatnak (Tsuda *et al.* 2008).

Az átfedések hátterében elsősorban az áll, hogy az adott stresszorra specifikus stresszválaszt közvetítő növényi szignálok, így főként a szalicilsav (SA), a jazmonsav (JA) illetve az etilén (ET) trió (Ton *et al.* 2002), és egyéb, a védekezésben kevésbé feltárt szerepű hormonok (β-amino-vajsav (Zimmerli *et al.* 2000, Ton és Mauch-Mani 2004), auxinok (Navarro *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007), abszcizinsav (Mauch-Mani és Mauch 2005, de Torres-Zabala *et al.* 2007), brasszinoszteroidok (Nakashita *et al.* 2003), sőt gibberellinek (Navarro *et al.* 2008) stb.) részben átfedő jelátviteli útvonalakat aktiválnak, melyek közt állandó és többlépcsős, aktuálisan szinergisztikus/antagonista finom hangolás zajlik, a kapcsolódási hálózat szövevényében (Dong 1998, Feys és Parker 2000, Hammond-Kosack és Parker 2003, Glazebrook et al. 2003, Koornneef és Pieterse 2008).

A válaszadásban résztvevő gének expressziója bizonyíthatóan megnövekszik növényevők illetve kórokozók megjelenésével, vagy egyéb, akár abiotikus stressztényezőkkel összefüggésben, az

indukálható gének pontos száma azonban, nagyszámú képviselőjük többszörös feladatköre miatt nehezen megbecsülhető. Reymond és Farmer (1998) a növényi védekezésben indukálható géneket funkciójuk szerint 6 fő csoportba sorolta, s bár osztályozásuk csak *Arabidopsisra* épült, az azóta különböző növényeknél elvégzett transzkriptomikai analízisek a felállított rendszert lényegében máig igazolják (Schena *et al.* 1995, Broeckling *et al.* 2005). A következőkben rövid áttekintést adunk az egyes osztályokba besorolt fehérjékről és azok funkcióiról.

1.) Az oxidatív stressz kapcsán szintetizálódó enzimek

A biotikus vagy abiotikus stresszor hatására kezdetben a redox-homeosztázis oxidatív irányú eltolódása következik be a növényi szövetekben, részben az azonnali, sejtsérüléssel összefüggő nem-specifikus oxidálódás, részben pedig az utóbb esetlegesen (1,5-3 h) kiváltható, oxidatív válaszban (pl. HR) aktiválódó enzimek következményeként. A reaktív oxigén fajták (ROS) szintézisében elsődlegesnek feltételezett, növényekben sokáig csak indirekt úton bizonyított NAD(P)H-oxidáz jellegű fehérje mellett mára egyes apoplasztikus peroxidázok, germin-szerű oxalát-oxidáz, lipoxigenáz és amin-oxidázok részvételét is feltételezik (Sagi és Flur 2001, 2006, Torres *et al.* 2002, Kuzniak és Urbanek 2000).

Épp előbbi folyamat ellensúlyozása céljából indul meg a stresszre érzékeny célgének első körének génexpressziója (>2-3 h), mely reduktív jellegű, s a jelátvitelt is befolyásolni képes változásokra vezet a növényi citoplazmában, sőt esetenként a sejtközötti állományban is. Ennek hátterében az oxidatív károsodást kivédő enzimfehérjék (SOD, POX, katalázok stb.) és az antioxidáns metabolitok (pl. karotinoidok,  $\alpha$ -tokoferol, aszkorbát, glutation) szintézisét kivitelező enzimek (így pl. APX, MDHAR, GR és DHAR ill. a korábban már említett G6PDH) megnövekvő expressziója áll. Emellett az apoplasztban átmenetileg további oxidatív hatású, a sejtfalat erősítő, keresztkötéseket fokozó és citocid hatású anionos peroxidázok is indukálódhatnak (Trezzini *et al.* 1993).

2.) Az aromás anyagcsere szintetizáló enzimei

Ebbe a körbe főként a fenil-propanoid útvonalban és a flavonoid bioszintézisben szereplő enzimek (pl. PAL, CHS) tartoznak, melyek, az indukált védekezés részeként sejtfalmódosítást (pl. papillaképződést, további lignifikációt) és aromás típusú antimikrobiális fitoalexinek (pl. kumarinok, sztilbének) termelését, sőt a szalicilsav szignálmolekula termelését is lehetővé teszik (Hammond-Kosack és Jones 1996).

3.) A triptofán-út enzimei

Ez a szintézisút a sejtsérülést okozó behatolók ellen védő indolvázas vegyületek, így egyes fitoalexinek (pl. camalexin) és indol-glükozinolátok képződéséhez vezet, de az auxin hormon szintézisében is közreműködhetnek.

4.) A zsírsav-szignalizáció és lipid metabolizmus enzimei

E fehérjéknek a terpenoid fitoalexinek és a membránjavítás alapanyagainak szintézise mellett a lipid jellegű szignalizáció alapjainak megteremtésében van kiemelkedő szerepük. Ide köthető az oktadekanoid-útvonal révén a jazmonsav szignál és rokon vegyületei, valamint a több szisztemikus reakcióban szereplő, lipid jellegűnek feltételezett hosszú távú szignálok előállítása ill. lebontása is.

- 5.) Jelérzékelés, korai és késői jelátvitel és szabályzófehérjék
  - a. receptorfehérjék és adaptoraik
  - b. ioncsatorna fehérjék
  - c. korai protein-kinázok (sejtfallal asszociált / Ca<sup>2+</sup>-függő / kalmodulin függő)
  - d. G-fehérjék
  - e. a MAP-kináz útvonal elemei
  - f. transzkripciós faktorok
  - g. Met-ciklus (ET-bioszintézis, SAM és ACC-szintáz)
  - h. auxin bioszintézis közreműködői

Az itt felsorolt elemek a fehérjék széles és diverz körét képviselik, s többségük kis mennyiségben, a preformált védelem részeként vagy egyéb szerepkörben, normál körülmények közt is kifejeződik. Ennek kapcsán merül fel az a fontos kérdés, hogy milyen tényezők irányítják a releváns szignáltranszdukcióban közreműködő proteinek rendelkezésre állását és az időzítés helyességét.

A gyors, fehérje szintű reguláció egy jelentős köre a poszttranszlációs módosulások lehetősége (PTM), mely a leggyakrabban foszforilálást, a redox-állapot megváltozását vagy egyéb, ritkább jellegű módosításokat jelent (Gupta *et al.* 1998, Meskiene *et al.* 1998). A PTM-ek egy további, kiemelt formája a transzkripciót szabályzó fehérjefaktorok poliubiquitinálása, s így a 26S proteaszóma lebontási útvonalra terelése, minek következtében a módosult fehérjék szabályozott proteolízis áldozatává válnak. Ez, a fehérjék aktuális mennyiségét is érintő stratégia a növényi stresszfolyamatok szabályzásában igen jelentős, s a kölcsönható partnerek függvényében mind a jelátvitel közvetlen gátlására, mind, a meglevő gátlások feloldása révén, aktiválásra is alkalmas (Dreher és Callis 2007, Beckers és Spoel 2006, Delauré *et al.* 2008). Hasonló, s gyakran a PTM hatásával is összefüggő eredményre vezet ugyanakkor, ha egy transzkripciós regulátor gátlása fehérje-fehérje kölcsönhatás révén következik be, melyre a citoszólban (Cao *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1997, Beckers és Spoel 2006) és sejtmagi szinten (Mosher *et al.* 2006) is ismerünk példákat.

#### 6.) PR (patogenezissel összefüggő) fehérjék szintézise

Mivel kísérleteim során behatóan foglalkoztam különböző PR-proteinek azonosításával és jellemzésével, bemutatásuknak külön fejezetet szentelek.

# 2.3.1 A PR FEHÉRJÉK

A PR rövidítés a "pathogenesis-related", azaz kórfolyamathoz kapcsolódó fehérjék megjelölésből származik, s olyan, fertőzés hatására indukálódó fehérjék összefoglaló megjelölésére szolgál, mint pl. a glükanázok, kitinázok, proteázok és proteáz inhibítorok (Heil és Balwin 2002). A PR fehérjéket a búzacsírában fedezték fel (Molano et al. 1979), indukálhatóságukat pedig elsőként reakciót TMV fertőzésre hiperszenzitív adó (dohánymozaik-vírus) dohánynövények levélkivonataiban igazolták (Van Loon 1999). Bár a PR proteinek eredeti definíciójuk értelmében biotikus stresszhatások kapcsán termelődő fehérjék (Linthorst és Van Loon 1991), bebizonyosodott, hogy egyes típusaik megjelenése vagy csökkenő expressziója abiotikus eredetű terhelésekkel (pl. UV-sugárzás, hideg, nehézfémek) is összefüggésben állhat (Antoniw et al. 1980; Gaudet et al. 2000). A PR proteinekhez hasonló fehérjéket újabban normál, nem fertőzött növények bizonyos szöveteiben azonosítottak, s ezeket PR-szerű fehérjéknek nevezték el (Van Loon 1999). Számos PR fehérje ugyanis az egyedfejlődés során szabályozottan meghatározott szervekben, szövetekben, illetve az életciklusnak csak meghatározott pontjain fejeződik ki. Így például egy 1,3-glükanázról bizonyították, hogy a mikrosporogenezis során fontos szerepet játszik, és hiánya hímsterilitáshoz vezethet (Jin et al. 1999), kitinázra pedig szükség van a sárgarépa szomatikus embriogeneziséhez (De Jong et al. 1992). Mivel ugyanazon PR-szerű fehérjét kódoló gén, amely legtöbbször egyedfejlődési kontroll alatt áll, más növényi szövetekben csak a stresszválasz hatására indukálódik, mai ismereteink alapján a megkülönböztető "PR" nomenklatúra túlhaladottnak tekinthető, és használatának létjogosultsága legalábbis megkérdőjelezhető, sok esetben zavart okoz.

A PR fehérjék különböző biokémiai és enzimaktivitással rendelkezhetnek. Elsődleges szerkezetük, szerológiai rokonságuk, enzimatikus és biológiai aktivitásuk alapján 17 családba (5. táblázat) sorolták őket (Hassan 2006). Az eddig ismert PR családok mindegyikének képviselőit azonosították már gabonafélékben.

Az egyes családokba tartozó fehérjék eltérő, részben átfedő funkciókat töltenek be. A PR2 fehérjecsalád glükanáz aktivitással bír, a PR3-nak endokitináz aktivitása van. Ismert, hogy a legtöbb gombafaj tartalmaz  $\beta$ -1,3-glükánt vagy kitint a sejtfalában (Bartnicki-Garcia 1968). Tisztított kitinázok és glükanázok vizsgálata során kimutatták, hogy számos gombafaj növekedését gátolni tudják, különösen együttesen hatva (Mauch *et al.* 1988). Egyéb, PR1 és PR5 tisztított fehérjék is mutattak antifungális aktivitást (Niederman 1995). A PR6 fehérjékről kiderült, hogy proteáz inhibítorként hatnak, célpontjaik a gomba vagy rovar eredetű proteázok. A PR7 endoproteáz, a PR9 peroxidáz, a PR10 RN-áz aktivitással rendelkezik. A PR fehérjék kimutatott széleskörű, leginkább hidroláz és inhibítor aktivitása összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy jelentős szerepük van a patogénfertőzés elleni védekezésben, amit a behatolóra jellemző speciális sejtkomponensek

bontásával, vagy a kórokozó növekedési környezetében kifejtett általános toxikus hatásukkal érnek el.

r					
Család	Molekulatömeg (kDa)	Funkcionális besorolás	Hatás / Lokalizáció	Referencia	
PR 1	14-17	Antifungális	nem ismert	Antoniw et al. 1980	
PR 2	25-35	1,3-β-glükanáz	sejtfal glükán	Antoniw et al. 1980	
PR 3	25-35	endokitináz (osztályok: I, II, IV, VI, VII)	sejtfal kitin	Van Loon 1982	
PR 4	13-19	endokitináz (prohevein)	sejtfal kitin	Van Loon 1982	
PR 5	22-26	ozmotin- és taumatinszerű fehérjék (TLP)	membrán / sejtfal	Van Loon 1982	
PR 6	6-13	proteináz inhibitor	proteináz	Green és Ryan 1972	
PR 7	69	Proteináz	nem definiált	Vera és Conejero 1988	
PR 8	28	endokitináz (osztály: III)	sejtfal kitin	Métraux et al. 1988	
PR 9	39-40	Peroxidáz	indirekt hatás	Lagrimini et al. 1987	
PR 10	17-18	RN-áz	patogén-RNS	Somssich et al. 1986	
PR 11	41-43	endokitináz (osztály: V)	sejtfal kitin	Melchers et al. 1994	
PR 12	5,6	Defenzin	membrán	Terras et al. 1992	
PR 13	14	Tionin	membrán	Epple <i>et al.</i> 1995	
PR 14	7-12	lipidszállító fehérjék (LTP)	lipid	García-Olmedo <i>et al.</i> 1995	
PR 15	22-26	oxalát-oxidáz vagy germin	sejtmembrán	Zhang et al. 1995	
PR 16	22-26	oxalát-oxidáz szerű, germinszerű fehérjék	sejtmembrán	Wei <i>et al</i> . 1998	
PR 17	27	nem ismert	-	Okushima <i>et al.</i> 2000	

5. táblázat: Patogenezissel kapcsolatos (PR) fehérjék családokba sorolása. (*Forrás*: Van Loon és Van Strien 1999, Van Loon *et al.* 2006, ill. az Utrecht-i Egyetem honlapja nyomán (http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm).

A PR-fehérjék kifejeződése ugyan nem egészen patogén-specifikus, azonban azt, hogy pontosan milyen PR-fehérjék indukciója indul be a fertőzést követően, alapvetően a gazdanövény fertőzésre adott válaszreakciójának típusa határozza meg. A szakirodalom biotróf patogének (szalicilsavútvonal) kapcsán főként az antifungális PR1, egyes 1,3-glükanáz enzimek (PR2), taumatinszerű (PR5) fehérjék illetve bizonyos típusú peroxidázok (PR9) expresszálhatóságát említi, míg a nektrotrófok és sebzés (jazmonsav- illetve etilén-jelátvitel) következményeként jellemzően inkább a kitináz ill. kitin-kötő aktivitással bíró enzimek (PR3, 4) és kisebb, Cys-gazdag antimikrobiális peptidek, így proteináz-inhibitorok (PR6), defenzinek (PR12), thioninok (PR13) és lipid-transzfer fehérjék (PR14) szintézise tekinthető általánosnak (Dong 1998, Feys és Parker 2000, Glazebrook 2001, Kunkel és Brooks 2002, Wang *et al.* 2002, Delauré *et al.* 2008). Mindazonáltal elmondható, hogy nemcsak a patogén ill. kártevő jellegétől, hanem esetenként magától a gazdanövényfajtól ill. fajtától is függ, hogy milyen stresszorra, ill. milyen szignál-kombinációban expresszálódik egy adott PR fehérje (Xu *et al.* 1994 ill. Potter *et al.* 1993, Samac *et al.* 1991 vs. Reymond és Farmer 1998). Köztudott, hogy egy adott kórokozó fertőzésére a különböző gazdanövények, akár egy-egy érintett PR fehérjecsalád indukcióját tekintve is (pl. izoforma és/vagy intenzitás szinten) eltérően reagálhatnak. A PR fehérjék specifikus készletének aktuális indukciója tehát gazdaspecifikus is egyúttal. Ahogy korábban már említettem, a mikroorganizmusok egyrésze ráadásul a JA-ET-SA szignál-trió valamely tagjának termelésével, analóg általi imitálásával vagy lebontásával, saját érdekében maga is képes befolyásolni, akár átprogramozni az eredetileg típusának megfelelően, a gazdaszervezetben releváns módon indukálódó génspektrumot (Cui *et al.* 2005).

A PR fehérjék génjei, gyakran akár több PR géncsalád, klaszterben helyezkednek el a genomban, ami közös szabályozásra utal. Bizonyos esetekben a PR gének mennyiségi tulajdonságot kódoló gének közelében lokalizálódnak. Számos PR fehérjét több mint egy gén kódol, s ezek gyakran egymással együttműködve fejtik ki hatásukat, ezért az eddigi vizsgálatok nem tudtak választ adni arra, hogy egy adott PR fehérje hiánya okoz-e megnövekedett érzékenységet patogénfertőzés vagy rovarkárosítás esetén (Muthukrishnan *et al.* 2001). A PR fehérjék szöveti előfordulása meglehetősen sokszínű: nemcsak a növényi sejten belül, például a vakuólumban vannak jelen, hanem szekretálódhatnak is (Ellis *et al.* 2007). Gyakran több funkcióval bírnak, és nagyfokú pH és hőstabilitást mutatnak, emellett ellenállóak a proteolízissel szemben is – feltehetőleg azért, mert eléggé ellenséges környezetben kell funkcionálniuk.

Ma már léteznek igen hatékony, speciális affinitáskromatográfiai módszerek bizonyos PR fehérjék izolálására, így például kitint vagy egyéb szubsztrátot tartalmazó oszlopok. Több PR fehérjét tisztítottak sikerrel ily módon, és arra is felhasználják őket, hogy meghatározott PR protein családokat specifikusan felismerő antitesteket állítsanak elő a segítségükkel (White *et al.* 1987, Pinto és Ricardo 1995, Osmond 2000). Emellett a megfelelő PR gének és cDNS-ek izolálására és klónozására is sor került. A különböző növényi PR fehérjék adatainak hozzáférhetősége céljából napjainkban többszáz szekvenciát tartalmazó adatbázisok (pl. PhytAMP) kezdenek kiépülni (Muthukrishnan *et al.* 2001, Hammami *et al.* 2009).

#### 2.3.1.1 Kitinázok és glükanázok

A különböző enzimaktivitású PR fehérjék egy speciális csoportját, a meglehetősen heterogén glükohidrolázokat szubsztrátjaik szerint két nagy csoportra, kitinázokra és glükanázokra bonthatjuk (Stintzi *et al.* 1993). Endokitináz aktivitással a PR3, PR4, PR8 és PR11 családok,  $\beta$ -1,3-glükanáz aktivitással pedig a PR2 családba tartozó fehérjék jellemezhetők (5. táblázat).

A **kitinázok** hidroláz aktivitású enzimek (poli[1,4-N-acetil-β-D-glükózamino]glükánhidrolázok; EC 3.2.1.14), melyek az N-acetil-glükózamin polimerjének hidrolikus hasítását katalizálják a  $\beta$ -1,4 kötések mentén. Hasítási helyük szerint két fő csoportba sorolhatóak: endo- (EC 3.2.1.14) és exokitinázokra (EC 3.2.1.29 és EC 3.2.1.30). Előbbiek a kitin polimer hidrolízisét random módon, oligomerek létrehozásáig kivitelezik, utóbbiak pedig a kitin láncok vége felől vagy az endokitinázok oligomer termékein egyesével hasogatva monomerekké bontják le azokat (Hassan 2006). Előfordulásuk kitint termelő és nem-termelő szervezetekben egyaránt lehetséges (Ruiz-Herrera 1992).

A növényi kitinázok legnagyobb hányada a PR-családok valamelyikébe tartozó endokitináz, csak néhányuknak van exokitináz aktivitása (Broglie és Brogue 1993). A kitinázokat molekuláris, biokémiai és fizikokémiai szempontok szerint csoportosítják. Az irodalomban többféle csoportosítás létezik. Ezidáig szerkezetükre alapozva hét (I-VII) osztályt különítettek el, melyek részben eltérő PR-családokba sorolhatók (vö. 5. táblázat). Egy másik megközelítés szerint a növényi kitinázok két fő ágra bonthatók: a glükozil-hidrolázok 19. családjának I., II. és IV. osztályú, csak növényekben izolált kitináz-formáira, valamint a konvergensen fejlődő, 18. glükozil-hidroláz családba sorolt, III. és V. osztályba tartozó kitinázokra, melyeknek nemcsak növényi, hanem bakteriális, gombaeredetű és állati formái is ismertek (Henrissat 1991, Hietala 2004). Az első ágba tartozó három, kizárólag növényi kitináz osztály az alábbi tulajdonságok alapján különíthető el: Az I. és a IV. osztály kitin-kötő domént hordoz, de egyéb tekintetben szekvencia hasonlóságuk alacsony szintű. A II. osztály tagjai jelentősebb homológiát mutatnak az I. osztály tagjaival, de ezeknél rövidebbek, mivel csak katalitikus doménnel rendelkeznek.

Bár minden osztály esetében létezik kivétel, az I. és IV. osztályba tartozó kitinázok általában bázikusak és a vakuólumban lokalizálódnak, míg a II. és III. osztály kitinázai legtöbbször savas pH-optimummal rendelkeznek és főként a sejtközötti állományba szekretálódnak (Payne *et al.* 1990, Mitsunaga *et al.* 2004). A különféle savas és lúgos típusú kitináz izoformák a genomban kis, elkülönülő csoportokat (klasztereket) alkotnak. Egy gazdanövényen belül különböző kitináz izoformák fordulhatnak elő, eltérő aktivitással. Bár a kitinázok lokálisan, a fertőzés helyén indukálódnak, felgyűlésük szisztémássá válhat a fertőzés által nem érintett szövetekben is (Pan *et al.* 1992).

A glükohidrolázok egy másik csoportját képezik a **glükanázok**. Számos endo-1,3- $\beta$ glükanázt azonosítottak és írtak le pl. a rizs (*Oryza sativa* L.) genomjában (Simmons *et al.* 1992; Romero *et al.* 1998, Akiyama és Aurugam Pillai 2001; Yamaguchi *et al.* 2002; Akiyama *et al.* 2004) és árpában (Høj és Fincher 1995), de az élelmezésben főszerepet játszó gabonanövényünkben, a hexaploid búzában (*Triticum aestivum* L.) expresszálódó glükanázokról (*Gns*) is rendelkezésre állnak már irodalmi adatok. A gabonafélékben előforduló glükanázokat szekvenciális jellegüket és funkciójukat is figyelembe véve alapvetően négy alcsaládba (A, B, C, D) sorolják (Romero *et al.* 1998, Higa-Nishiyama *et al.* 2006). A szekvenciálisan heterogén A-alcsalád a glikozil-hidrolázok 17. családjába tartozó endo-1,3-β-glükanázokat foglalja magába (hivatalos nevükön glukán endo-1,3-β-D-glükozidázok vagy laminarinázok), amelynek tagjai különböző stresszélettani változásokhoz kötődnek (PR2 fehérjék) vagy alapvető fiziológiai folyamatokban vesznek részt, így például a csírázásban és a virágfejlődésben (Akiyama *et al.* 2004). A következő, B-alcsaládba az 1,3-1,4-β-glükanázok sorolhatók, melyek az 1,3-1,4-glükánok 1,4-kötéseit hasítani képes enzimek, s evolúciós eredetüket tekintve fiatalabbak, az előbbi csoportból levezethetőek (Høy és Fincher 1995). A C-alcsalád tagjai fontos szerepet tölthetnek be a növényi fejlődésben, a D-alcsalád pedig az előbbi háromtól szerkezetileg teljesen elkülönülő glükanáz fehérjéket foglalja magába (7. ábra).



7. ábra: A gabonafélék glükanázainak filogenetikai kapcsolatrendszere. A törzsfa elkészítéséhez a világosszürke háttérrel bekarikázott, 2006-ban Higa-Nishiyama által identifikált (*TaGlb2a-f*), valamint az NCBI-adatbázisban szereplő aminosav szekvenciákat használták fel, melyeket CLUSTALW-programmal hasonlítottak össze. Az NCBI-adatbázisból származó szekvenciáknál a GenBank fehérje-szekvenciák azonosító száma került feltüntetésre. A búza PR2 fehérjéket aláhúzva jelölték meg. Az azonosító számok utáni zárójel azon egyszikű fajokat jelöli, ahonnan az adott glükanáz származik. Eszerint: *Os* – rizs; *Ta* – búza; *Hv* – árpa.

A kitinázok és glükanázok (stressz)biológiai szerepéről mindmáig nem alakult ki egységes vélemény az irodalomban. A PR proteinek egyes családjaiba tartozó fehérjék, eredetük és szerkezetük szerint különbözőek ugyan, de részben átfedő funkciókat tölthetnek be. Így a kitinázok és különböző, PR-családba sorolt glükanáz-típusok szinergista módon képesek gátolni a gombapatogének növényen belüli fejlődését (Mauch *et al.* 1988). Ez annak köszönhető, hogy a legtöbb gombafaj sejtfalát főként kitin, egy N-acetil-glükóz-amin polimer ill. előbbivel keresztkötésben, mélyebben fekvő β-glükán rétegek építik fel (Bartnicki-Garcia, 1968). A növény

így, a gomba kitin polimerének 1,4-β-D-glükozidos és a 1,3-β-D-glükánok láncon belüli 1,3-β-Dglükozidos kötéseinek egyidejű random hidrolízise által valóban kimerítő hatékonysággal, aktívan képes gátolni a betörő kórokozó növekedését.

A micélium növekedését és a gombaspóra csírázását gátló hatást már számos gombára nézve, pl. *Trichoderma, Fusarium, Alternaria* esetében is, kimutatták (Schlumbaum *et al.* 1986). A gombafal összetételének különbözősége miatt a patogén gombák ill. ezen belül akár különböző képleteik is eltérő érzékenységet mutatnak a növényben kifejeződő glüko-hidrolázokkal szemben, így pl. a búza szárrozsda sztóma alatti vezikuluma és a növekvő hifa maga nem, de a csírázó spóra tömlőfejlesztése és a betüremkedő hausztóriumok fejlődése gátlódik a kitinázok és endo-1,3-glükanázok hatására (Mohammadi *et al.* 2001). Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy az erőteljesebb kitináz vagy endo-1,3-glükanáz indukció nem minden esetben jár együtt a rezisztencia megjelenésével (Kragh *et al.* 1990).

A növényi kitinolitikus és endo-1,3-glikozidáz aktivitásnak ugyanakkor közvetett szerepe is van a növényi védekező rendszerben azáltal, hogy oligoszacharid elicitorokat szabadít fel a gomba eredetű kitinből (Chesters és Bull 1963a,b). Ez a (kito-)oligoszacharidoknak való kitettség a növényekben sokféle választ indukál, többek közt antifungális fitoalexinek szintézisét, kitinázok további indukálását, K<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> felszabadulását a sejtekből, amely végül az extracelluláris közeg ellúgosodásához, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődéshez s egyéb, a védekezésben közreműködő gének aktivitásának indukálódásához vezethet (Kurosaki *et al.* 1988, Ride és Barber 1990, Jollés és Muzzarelli 1999). Annak ellenére, hogy a növényi kitinázoknak elsősorban antifungális hatásait vizsgálták, ízeltlábú rágó kártevők ellen is hatékonyak (Mayer *et al.* 1995). A rovarevő növények egyrésze szintén termel kitinázokat (Gooday 1990), amelyek az áldozat külső emésztését könnyítik meg. Ez utóbbi a védő szerepű konstitutív kitinázok egyfajta adaptációjaként is felfogható.

Néhány növényi kitináz molekula a kitinbontó aktivitástól eltérő védő funkcióval is rendelkezik. Például egy vad gabonafélében (*Coix lacrima-jobi*) rovar alfa-amiláz inhibitor aktivitású endokitinázt írtak le (Ary *et al.* 1989). Egy trópusi gyógynövény (*Trichosanthes kirilowii*) ugyanakkor, 28S rRNS N-glikozidáz (RN-áz) aktivitása révén riboszóma-inaktiváló hatású, III. osztályba sorolt endokitinázokat termel (Remi Shih 1997). Néhány kitinázról kiderült, hogy lizozim aktivitással rendelkezik, és képes a bakteriális peptidoglükán réteg hidrolízisére, tehát szinergista antibakteriális szerepe lehet (Collinge *et al.* 1993, Lee és Hwang 1996, Düring 1993). A növényi kitinázok egyrésze ugyanakkor, speciális térszerkezete révén mint "antifreeze-protein", a jégképződés mikéntjének befolyásolásával a fagystressz elleni védekezésben is szerepet játszhat, abiotikus és biotikus stresszorokra egyfajta keresztrezisztenciát kialakítva (Yeh *et al.* 2000). Hasonlóan, antifungális szerepkörük mellett az 1,3-glükanázok is közreműködhetnek a növény egyes abiotikus stresszfolyamataiban, így ismert pl. ózon, UV-B, foszfáthiány, sebzés, fagyhatás induktív szerepe kifejeződésükben (Schraudner et al. 1992, Ernst et al. 1996, Thalmair et al. 1996, Lambais és Mehdy 1998, Ignatius et al. 1994, Hincha et al. 1997, Krishnaveni et al. 1999). Emellett – jórészt a kallóz, egy sokrétű szerepkört betöltő növényi béta-1,3-glükán, mint szubsztrát hasítása révén – számos képviselőjük szaporodás- és fejlődésbiológiai jelentőséggel is bír (Jin et al. 1999, Leubner-Metzger és Meins 1999, Doxey et al. 2007). Szerepüket a tapétumsejtek szekréciója folytán a mikrosporogenezisben (Worral et al. 1992, Bucciaglia és Smith 1994), emellett a pollencsírázás és pollentömlő növekedés folyamán (Roggen és Stanley 1969, Meikle et al. 1991) s a megtermékenyítésben is igazolták (Lotan et al. 1989, Ori et al. 1990). Úgy tűnik továbbá, hogy az egyed korai és késői differenciációs folyamataiban is közreműködnek, így pl. az embriogenezisben (Dong és Dustan 1997, Helleboid et al. 1998), a szénhidrát raktárkészletek mobilizálásával a magcsírázásban (Fincher és Stone 1993, Vögeli-Lange et al. 1994, Leubner-Metzger et al. 1995, Leubner-Metzger 2003) és a lombhullatók rügynyugalmának megszüntetésében (Krabel et al. 1993), valamint a középlemez fellazításával a gyümölcsérésben is (Hinton és Pressey 1980) bizonyították már fontosságukat.

Az előbbi példákból látható, hogy a PR proteinek e két csoportjára is igaz, hogy eredeti definíciójuknak megfelelő (Antoniw *et al.* 1980), biotikus stresszhatásra mutatkozó indukciójuk mellett számos esetben abiotikus terhelésre is expresszálódhatnak (Kombrink *et al.* 1988), sőt – megfelelő szöveti előfordulás vagy élettani állapot függvényében – a normál élettani folyamatok nélkülözhetetlen szereplői lehetnek (Van Loon 1999).

Előbbiek szellemében érthető, miért övezi olyan nagy érdeklődés a gabonafélékre specializálódott kártevők elleni biológiai védekezés erősítését olyan transzgénikus fajták előállítása révén, amelyek az ellenállóságot idegen eredetű kitináz vagy endo-1,3-glükanáz expesszióval biztosítanák (Collinge *et al.* 1993).

# 2.4. A NÖVÉNYI STRESSZFOLYAMATOK RENDSZER SZINTŰ MEGKÖZELÍTÉSE

A molekuláris biológia robbanásszerű fejlődése megteremtette az igényt, hogy az élőlényeket a maguk teljességében, rendszerként vizsgáljuk és kíséreljük meg megérteni. Ezt az igényt kiszolgálandó új, rendkívül precíz és nagyszámú minta kezelésére alkalmas kémiai analitikai

eljárásokat dolgoztak ki, ill. megfelelő mérőműszereket és informatikai hátteret hoztak létre (Ideker *et al.* 2001, Kersey és Apweiler 2006). Ezzel napjainkra valóban lehetővé vált a biológiai problémák rendszer szintű megközelítése. Jelenleg egy új tudományterület, a rendszerbiológia születésének lehetünk tanúi, ami a biológia, de az orvostudomány és az agrobiológia területén is teljesen át fogja alakítani szemléletmódunkat.

A rendszerbiológiai megközelítés azt feltételezi, hogy a fiziológiai folyamatok megértése nem lehetséges egy vagy néhány kiragadott tulajdonság, azaz lényegében egy prekoncepció alapján, hanem ehhez az élőlény kiválasztott szerveződési szintjének összességét kell vizsgálni. Egyszerűbben és konkrétabban: a rendszerbiológia tárgya a teljes genom, az adott élettani állapotban expresszált valamennyi RNS és fehérje, valamint a jelenlévő valamennyi anyagcseretermék vizsgálata és összehasonlító analízise (Tan *et al.* 2009). A szerveződési szinteknek megfelelően beszélünk genomikáról, transzkriptomikáról, proteomikáról és metabolomikáról.

Az értekezésemben leírt kutatások alapját minden esetben a proteomikai megközelítés képezte. A proteomika kifejezés az 1994-ben bevezetett "proteóma" fogalomból származik, ami egy szerv, szövet vagy sejt különböző belső és külső hatások által szabályozottan megjelenő fehérjemintázatát jelenti (Wilkins 1996). A proteomika a szervezet felépítését és működését konkrétan meghatározó fehérjék megismerésével foglalkozik, vizsgálja a fehérjék szerkezetét, képződését, megfelelő helyre való eljutását, a mintázat térbeli és időbeli változását, a fehérjék működését, interakcióikat, valamint a folyamatok összehangolását és szabályozását különböző fejlődési állapotokban és környezeti feltételek között (Agrawal *et al.* 2005b,c, Qureshi *et al.* 2007, Mehta *et al.* 2008, Bhadauria *et al.* 2009). A proteomika legfontosabb eszközei a kémiai analitika, melynek segítségével a kis mennyiségben jelenlévő fehérjéket is képes elemezni, és a bioinformatika, ami lehetővé teszi a vizsgált fehérjék azonosítását (Rossignol *et al.* 2006, Castillejo *et al.* 2004, Agrawal *et al.* 2005a).

Legtöbbször kétdimenziós gélelektroforézist, azaz izoelektromos pont és molekulatömeg alapú két lépcsős elválasztást alkalmaznak tömegspektrometriai analízissel kombinálva (2 DE-MS), hogy megvizsgálják például a különböző genotípusú növényfajták meghatározott stresszfaktorokra adott fehérjeválaszát. A stressz jellegzetes mennyiségi és minőségi változásokat idéz elő a fehérje-profilban, a fehérjék időbeli és térbeli kifejeződésének mintázatában, ami azután a növények fenotípusában is megnyilvánulhat (Rossignol *et al.* 2006). A stressztűrés fiziológiájának megértése érdekében a proteomika a stressztűrésükben eltérő, különböző genetikai hátterű növényi genotípusok (pl. fajták, mutánsok, transzgenikusok), illetve optimális körülmények között tartott kontroll és stresszhatásnak kitett növények 2DE proteinmintázatát hasonlítja össze. Ha az e kísérletekben különbségként azonosított proteinfoltok megjelenése statisztikailag igazoltan

stresszválaszhoz kötődik, akkor ezeket a gélből kivágva proteolitikus, általában tripszines emésztés után tömegspektrometriás módszerek segítségével azonosítják a fehérjéket (Rossignol *et al.* 2006). A proteomikai vizsgálatok a fehérjemintázatban mutatkozó minőségi különbségeken túl a mennyiségi eltérésekre is kiterjednek, annál is inkább, mert a proteomikai analízis során több specifikus növényi szövetnél és szervnél nyilvánvalóvá vált, hogy a védelmi és stresszindukált fehérjék az adott stressz hiánya esetén is nagy mennyiségben jelen lehetnek, támogatva azt az elképzelést, hogy egyes proteinek a védelem több területén is fontos szerepet játszanak (Rossignol *et al.* 2006).

A növényi proteoma-kutatások középpontjában kétszikű modellnövényként az *Arabidopsis thaliana*, illetve egyszikű modellnövényként az *Oryza sativa* áll (Rossignol *et al.* 2006). A lúdfű teljes genom szekvenálása 1990-ben, a rizsé 2004-ben befejeződött, s az adatok online adatbázisban mindenki számára hozzáférhetők (Agrawal és Rakwal 2006). Ez jelentősen leegyszerűsíti a tömegspektrometriai (MS) adatokon alapuló fehérjemeghatározást. A proteomika ugrásszerű térhódításának alapját ugyanis a nagyon pontos tömegmeghatározásra alkalmas spektrométerek megjelenése teremtette meg (Gygi és Aebersold 2000). Az egyes fehérjék azonosítása az őket alkotó triptikus peptidek tömegének pontos meghatározásán és az adatbázisokban lévő ismert fehérjék peptidtömegeivel való összehasonlításon alapul, ami egyes peptidszekvenciák pontos meghatározásával is megerősíthető. Nyilvánvaló, hogy az azonosítás esélyei egy organizmusnál annál jobbak, minél pontosabban ismert a genomja. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy bár pl. az *Arabidopsis* genomja jól meghatározott, a kódolt fehérjék 1/3-a mindezidáig ismeretlen (Cánovas *et al.* 2004).

Mérsékelt égövi fő gabonanövényünk, a búza (*Triticum aestivum* L.) proteomikai analízise komoly nehézségeket okoz. Ennek oka, hogy a búza óriási genommal rendelkezik (17.000 Mbp – az *Oryza* génállományának negyvenötszöröse), allohexaploid (2n=6x=42, AABBDD genom), a fajták, fajtakörök rendkívül sokfélék (Bahrman *et al.* 2004a) és egyelőre az adatbázisokban is komoly hiányosságok vannak, mert az annotáció nem teljes, és gyakran csak cDNS klóntárak állnak rendelkezésre. A nehézségek ellenére a molekuláris szinten kevésbé jól jellemzett, de gazdaságilag jelentős haszonnövények proteomikai vizsgálata fontos és napjainkban is aktuális kutatási cél, mert korlátai ellenére lehetőséget teremt a konkrét fiziológiai és biokémiai folyamatok tanulmányozására és az ismeretek hasznosítására a nemesítésben, termesztésben és felhasználásban (Incamps *et al.* 2005).

A kísérleti megközelítés oldaláról nézve a proteomikai vizsgálatok kezdő és egyben meghatározó lépése a mintaelőkészítés (8. ábra). Mára a teljes növényi fehérjekészlet kivonására, vagy éppen növényi szervekre (levél, gyökér, sejt szuszpenzió) specializált protokollok állnak rendelkezésre.

Egyes, fokozott érdeklődésre számot tartó növénycsoportok, így pl. gabonanövények fehérjéire nézve speciális kivonási technikákat is kifejlesztettek (Natarajan *et al.* 2005). A növényi sejtek és szövetek sokfélesége és gyakran limitált mennyisége miatt jelenleg fontos metodikai cél a kis mennyiségű szövetből, meghatározott sejttípusból, illetve szubcelluláris frakciókból (pl. izolált sejtalkotókból) történő mintaelőkészítés. Ezek mindegyike többé-kevésbé egyedi fehérjemintázattal rendelkezik (Majeran *et al.* 2005), és elkülönített tanulmányozásuk a célzottabb kérdésfeltevésen túl a minták kezelhetőségét is javítja a komplexitás csökkentésével (Rossignol et al., 2006). További előny a szubproteomikai analízisekben, hogy olyan, a növény egészében alacsony koncentrációban jelenlévő proteinek azonosítása is lehetővé válik, amelyek csak az adott sejttípusban vagy szubcelluláris lokalizációban halmozódnak fel/jelennek meg kimutatható mennyiségben.

Az izolált fehérjeelegyek szeparálására ma alapvetően két fő eljárást használnak, melyek egymást kiegészítő módon szolgálják a fehérjék azonosítását (8. ábra). Ma még a fehérjék poliakrilamid mátrix alapú, két-dimenziós gélelektroforetikus elválasztása (2D-PAGE) a leggyakoribb szeparációs technika, sőt, mivel esetenként az egy dimenziós, denaturáló SDS-PAGE is jó minőségű elválasztást eredményez, alacsony költsége és egyszerűsége miatt még ezt is elterjedten használják (Lee et al. 2004). 2004-től kezdődően az ún. második generációs proteomika technikák is egyre szélesebb körben terjednek. A kiváló tömegspektrometriai fejlesztéseket és műszerezettséget ez esetben olyan, részben automatizált konvencionális elválasztási technikákkal párosítják, mint a fehérjék és/vagy peptidek folyadékkromatográfiája (liquid chromatography, LC). Ezzel nemcsak a felbontás és az elválasztási hatékonyság szintjét emelték meg, de az analizálható fehérjék körét is kibővítették egyes, korábban nehezen kezelhető fehérjecsaládokkal. Így egyre jobban felértékelődik a nem gél alapú szeparációs technikák bevonása, a MudPIT-et (Multidimensional Protein Identification Technology, multidienzionális fehérje azonosítási technika) is magába foglaló LC, azaz az előemésztett fehérjék elválasztása folyadékkromatográfiával, mely a hidrofób fehérjék identifikálásához is jól használható (Koller et al. 2002, Borner et al. 2005, Vítámvás et al. 2007).



**8. ábra:** A proteomikai azonosítás folyamatábrája. A kivonást követően kétféle elválasztási technológia alkalmazható: a gélelektroforézis során izoelektromos pont és/vagy molekulatömeg, az oszlopkromatográfia esetében a mátrixhoz való affinitásuk szerint választódnak el a fehérjék.

# 2.4.1 A gabonafélék proteomikája

A gabonafélék közül rizs és kukorica esetében – elsősorban a genomszekvenálások előrehaladt volta révén – már jelentős proteoma-adatbázissal rendelkezünk:

A rizs (Oryza sativa ssp. japonica ill. indica), mint elsőként megszekvenált gabonafaj (Niiler 2000, Goff et al. 2002 és Yu et al. 2002) szisztematikus proteomikai vizsgálata a '90-es évek elején indult meg, és mára lehetővé vált a különféle biotikus és abiotikus faktorok teljes protein-profilra gyakorolt hatásának vizsgálata is. E vizsgálatok során egyfelől lehetővé vált egyes specifikus stresszindikátorként is alkalmazható proteinek, pl. sóstressz esetén egy aktin-depolimerizáló faktor azonosítása, másfelől megállapították, hogy bizonyos PR proteinek (OsGLN1, OsPR1a és b, OSPR5, 3 eltérő OsPR10) és antioxidáns enzimek (SOD, APX), valamint a RuBisCO számos stresszhatásra indukálódnak (Akiyama és Pillai 2001, Rakwal et al. 2003, Jung et al 2006). Ge és mtsai (2009) rizs kadmiumstressze kapcsán a Cd<sup>2+</sup> kelatálását és kompartmentalizációját végző, szabad gyököket elimináló, méregtelenítő, denaturált és inaktiválódott fehérjék lebontását végző fehérjéket, anyagcsere szabályzó, valamint PR proteineket is azonosítottak. Az analízis érdekessége, hogy a kadmiumra érzékeny és toleráns fajtában indukálódó fehérjék összevetésével több proteinben különbséget találtak: míg előbbiben egy  $\beta$ -glükozidáz és egy RN-áz aktivitású PR 10 fehérje drasztikus expresszióját állapították meg a levélben és a gyökérben, addig egy UDP-glükóz protein-transzglükoziláz és egy transzlációs elongációs faktor jelent meg a toleráns fajtában, ami talán utóbbi nagyobb ellenállóképességével is összefüggésben állhat.

A söriparban is jelentős árpa esetében egyelőre a maláta alapját képező magvak kimerítő proteomikai analízise történt meg, jórészt a svéd Svensson és mtsai (Østergaard *et al.* 2002, 2004,

Bak-Jensen et al. 2004, Hynek et al. 2006, Bønsager et al. 2007, Finnie et al. 2002, 2004a,b, Finnie és Svensson 2009) és újabban egy cseh kutatócsoport jóvoltából (Rehulková et al. 2009). A fejlődő árpanövényt érő stresszfaktorok, mint pl. a hő (Süle et al. 2004), a só (Witzel et al. 2009), illetve kórokozói (Seul et al. 2007; March et al. 2007; Geddes et al. 2008) fehérje-profilra való hatása kapcsán azonban, csak elvétve és újabban találunk közleményeket. Seul és munkatársai (2007) egy fitohormonokkal és egyéb szupresszorokkal manipuláló kórokozó, a *Paenibacillus polymyxa* fehérjemintázatát vizsgálta szaprotróf ill. nekrotróf környezetben, árpa gazdanövényen. March és mtsai (2007) az árpa szemtermés feketedését okozó tünetegyüttes analíziséből egy LEA protein és egy peroxidáz 1 (BP1) gén intenzívebb expresszióját, de fehérjéjének gyengébb szintű jelenlétét mutatták ki a kórhoz kötődően, mely a fehérjék gátolt transzlációját vagy nagymérvű degradációját is feltételezheti. Geddes munkacsoportja (2008) hat eltérő rezisztenciát mutató árpafajta *Fusarium*fertőzése kapcsán három eltérő típusú fehérjemintázatot tudott azonosítani: a 43 fehérjéből a rezisztensebb vonalaknál inkább egyes savas PR3 és PR5 fehérjék indukciója, míg az érzékeny vonalakban előbbiek csökkenése vagy stabilitása mellett az oxidatív tünetegyüttest előkészítő fehérjék (malát-dehidrogenáz és peroxidázok) expressziója volt a domináns.

Búza proteoma-projektek, nem utolsósorban a fajta- és ökotípus-diverzitás jelentős mértéke miatt csak a '90-es végén indultak. A rizséhez viszonyított közel 40x-es genommérete  $(16x10^9 \text{ bp})$  és allohexaploiditása a rokon fajok közti összehasonlító analízist mind a funkcionális, mind pedig a fizikai térképezés terén nehezíti (Sorrels *et al.* 2003).

Egészen a legutóbbi évekig a búzánál is a szemtermés állt a kutatás középpontjában (Islam *et al.* 2002, Andon *et al.* 2002, Kamal *et al.* 2009). A vizsgálatok főként a kenyértészta minőségének és potenciális allergenitásának befolyásolásában kiemelt szerepet játszó, fejlődő vagy érett amiloplasztiszra irányultak (Vensel *et al.* 2005, Balmer *et al.* 2006), mely a mag táplálószövetének, az endospermiumnak a legfőbb raktározott és magfehérje-forrása és a keményítőfeltöltés szabályzásának is meghatározó eleme. Az abiotikus környezeti stresszfaktoroknak a búza endospermium fehérjemintázatára gyakorolt hatását szintén több kutatócsoport is vizsgálta (Majoul *et al.* 2003; Sancho *et al.* 2008), de a kromoszómadeléciók, ill. di-, tetra- és hexaploid búzavonalak összevetése révén a genom-interakció magi proteinmintázatot befolyásoló hatása is kutatások tárgya (Islam *et al.* 2003a,b).

A búzanövény vegetatív szöveteinek jellemzésére először a levélről jelent meg két, igen részletes proteoma referenciatérkép Récital és Arche (Bahrman *et al.* 2004a) ill. TXGBE307 őszibúzavonalakban (Donnelly 2005), LC-MS/MS illetve 2D-PAGE–alapú proteomikát alkalmazva. Közel fél-félezer (541 ill. 404) protein elválasztása, majd kb. félszáz (55) ill. csaknem 300 fehérjespot (277) sikeres szekvenálása és azonosítása alapján elmondható, hogy a jelenleg felvázolható búzalevél-proteoma fajspecifikus, a Poaceae család más tagjaira is jellemző, valamint egyéb eukarióta fajokkal rokon, és bakteriális szekvencia homológiát mutató proteineket egyaránt tartalmaz. Fehérjeprofiljának funkcionális megoszlási arányai a szervi jellegnek megfelelően, és egyéb fajok - kukorica (Porubleva et al. 2001) ill. lucerna (Watson et al. 2003) - proteomikai adataival is összevethetően alakulnak, az alábbiak szerint: az azonosított fehérjék 24 %-a energiatermelő folyamatok résztvevője, 12 %- ill. 4 %-uk első és másodlagos anyagcsereutak tagjai, 4 % raktározott fehérje, 7 % a sejtosztódás és -növekedés, 5-5 % transzkripció és proteinszintézis, 2 % ill. 3 % inter- és intracelluláris transzport résztvevője, 4 % struktúrfehérje, 10 % a jelátvitelben, 12 % pedig a növény védekező mechanizmusaiban játszik aktív szerepet (pl. betegség során indukálódó, stresszválaszt kiváltó ill. különféle rezisztenciaproteinek, védőfehérjék, a sejthalál szabályzásában, detoxifikációban résztvevő proteinek, stb.). Az adatbázisok intenzív fejlődését mutatja mindeközben, hogy a szekvenált proteinek mindössze 8 %-ának szerepe maradt tisztázatlan. A búza gyökér proteoma publikálása csak pár évet váratott magára. Song és mtsai 2007-ben 2-DE, MALDI-TOF és tandem MS/MS kombinálásával a detektált, közel 450 szolubilis, savas jellegű (pH 4-7) fehérjéből 240 azonosítását végezték el. A különféle funkciójú proteinek megoszlásában, a levél-proteomával összevetve fő különbségként az adódott, hogy az általános anyagcserében és transzportfolyamatokban közreműködő fehérjék felül-, míg az energiaháztartás, a kórfolyamatokkal és védekezéssel kapcsolt, illetve a transzkripcióban és a jelátviteli folyamatokban szerepet játszó proteinek a hajtáshoz képest alulreprezentáltak.

A búzalevél ill. gyökér referencia-fehérjetérképének megalkotása megteremtette az alapot az összehasonlító proteomikai vizsgálatokhoz. Ennek köszönhetően indulhatott komplett proteomaelemzés a nitrogénellátottság (Bahrman *et al.* 2004b), sóstressz (Huo *et al.* 2004, Caruso *et al.* 2008), szárazság (Hajheidari *et al.* 2007), fagyhatás (Herman *et al.* 2006) és nehézfémek (Cd, Hg), herbicidek és safenerek (Zhang *et al.* 2007, Ge *et al.* 2009), valamint a kórokozók (Zhou *et al.* 2006) búza-proteinprofilra gyakorolt hatásának megállapítására. Utóbbi, a búza korai *Fusarium*támadása azért is érdekes, mert mind a gazda, mind pedig a patogén protein-profiljában találtak eltéréseket, így az elválasztott 1380 fehérjéből azonosított 41 protein alapján pl. az antioxidánsútvonalban és a jazmonsav-jelátvitelben, a patogenezissel kapcsolt válasz kialakításában, az aminosav-szintézisben és nitrogén-anyagcserében közreműködő fehérjék expressziója indukálódott, míg a fotoszintézis képviselete jelentősen lecsökkent (7/41 fehérje). Különös, hogy egy DNSkárosításra érzékeny glükoprotein is kifejeződött a gazdanövényben. A nyolc gomba-eredetű fehérje antioxidáns ill. glikolízist támogató szerepkörrel bír, ami arra utalhat, hogy a redukált szénforrás megszerzése központi szereppel bírhat a nekrotróf patogén életében.

Árpában és búzában folytatott kísérleteim az apoplaszt proteomikai vizsgálatára irányultak.

# 3. CÉLKITŰZÉS

Doktori témám célja a növény fehérjemintázatában tükröződő stresszválasz kutatása volt, melynek során biotikus és abiotikus környezeti tényezők hatását vizsgáltam a növény egy speciálisnak tekinthető szöveti régiójában, a sejtközötti állományon.

- 1. Elsőként, a biotikus stresszrezisztencia-kutatásokkal összefüggésben arra kerestük a választ, hogy mutatnak-e közel izogén, rezisztens ill. fogékony búzavonalak az apoplaszt fehérjemintázatában kimutatható különbséget a búza (*T. aestivum* L.) termesztett állományait jelentős mértékben veszélyeztető levélrozsda (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) fertőzést követően. Bár a választott Lr1 és Lr9 rezisztenciagéneket hordozó vonalak szántóföldi alkalmazhatóságának különbségei tapasztalati szinten jól ismertek, s a témában hazánk középeurópai viszonylatban jelenleg különösen érintett a rasszspektrum aktuális átrendeződése miatt, a rezisztenciagének jelenléte kapcsán módosuló stresszválaszok mikéntje az érintett gének ill. fehérjéik szintjén egyelőre alig kutatott terület, noha az ismeret jelentősen segíthetné a gének piramidálásban való, célzottabb felhasználását. Az apoplasztfehérjék vizsgálatát gél alapú, differenciál expressziós proteomikai eljárással, tömegspektrometriai alapon ill. aktivitás vizsgálatokkal kiviteleztük. A feltételezett indukció megerősítésére ill. az esetleges szabályozási eltérések tesztelésére transzkripciós analíziseket végeztünk.
- 2. Abiotikus stresszként a nehézfémszennyezés különböző formái közül világméretben is számottevő kockázatot hordozó kadmium-kezelést választottuk, az árpa mérsékelten ellenálló cv. 'Mandolina' fajtájának csíranövényein. Proteomikai analízisünk arra irányult, hogy tisztázzuk, azonosíthatóak-e a nehézfémstresszre specifikusan szekretálódó vagy megnövekvő intenzitású fehérjék a sejtközötti állományban, vagy a közegben esetlegesen megfigyelhető változások inkább a kadmium kapcsán másodlagosan fellépő, általánosabb jellegű stresszválasz közreműködőivel társíthatóak.
- 3. Végül, proteomikai térképezést kezdtünk meg a genetikai állományát tekintve a búzafajták közt leginkább kutatott cv. 'Chinese Spring' egészséges csíranövényeinek apoplasztján, hogy megismerjük, normál élettani körülmények között milyen feladatkörű fehérjék vannak jelen egy korai fejlődési állapotú vegetatív szerv, a levél intercellulárisaiban. A munka távolabbi célja, hogy a stresszválaszok jövőbeni katalogizálásához megfelelő referenciatérkép létrehozásával szolgálhassunk.

Vizsgálataink mind a biotikus, mind pedig az abiotikus stresszorhoz köthető modellrendszerben leginkább a stresszfehérjék egy meghatározott körére, az ún. PR ("pathogenesis-related", kórfolyamattal összefüggésbe hozható) fehérjék szekretált formáinak esetleges indukciójára, specificitásukra, a különféle genetikai háttér kapcsán az esetleges szabályozási eltérések különböző,

fehérje-, RNS- ill. DNS-szintű megjelenési formáira, és az eltérések a stresszválasz kimenetelével összefüggő vonatkozásaira irányultak.

# 4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

# 4.1. Kísérleti növényanyag és mintaelőkészítés

## 4.1.1. A fajtaválasztás háttere

Az apoplaszt fehérjék referencia-térképezéséhez a *Triticum aestivum L*. cv. 'Chinese Spring' fajtájú búzát választottuk, mert ez tekinthető az egyik legintenzívebben vizsgált fajtának a nemzetközi együttműködésben folytatott búza genomikai vizsgálatokban (Ogihara *et al.* 2000, Allouis *et al.* 2003, Gill *et al.* 2004, Shen *et al.* 2005). A szemtermések a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézetből, Dr. Kovács Gézától (Gabona Génbank) származtak.

A gombafertőzéssel asszociált növényi fehérje és génexpresszió-változás vizsgálatára gazdanövényként a *Triticum aestivum* cv. 'Thatcher' búzafajtát választottuk, mert a rezisztencianemesítés eredményeképpen ez a genotípus számos közel izogén, de 1-1 rezisztenciagénben eltérést mutató vonallal rendelkezik (Dyck és Samborski 1968, Bartos *et al.* 1969), melyek a patogén virulencia változásának kutatása mellett a rezisztenciagének feltérképezésében és jellemzésében is kiválóan hasznosíthatóak (Winzeler *et al.* 2000, Chełkowski *et al.* 2003). Kísérletünkben a legtöbb búza levélrozsda rasszra fogékonyan reagáló, *Triticum aestivum* cv. 'Thatcher' búzafajta és annak két, közel izogén (statisztikailag ~98%-ban azonos genetikai állományú), *Lr1* illetve *Lr9* rezisztenciagént hordozó búzavonala szolgált forrásul, melyek csíranövénykori ellenállóképességet biztosíthatnak. A Tc és Lr9 magállomány az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetéből, Dr. Manninger Sándornétől (NKI, Kórélettani Osztály) származott, az Lr1-hez pedig kiegészítő forrásként James A. Kolmer (U.S. Department of Agriculture, ARS - Cereal Disease Laboratory) nagylelkű ajándékaként jutottunk.

A kadmium-kezelés kísérleteit az árpa (*Hordeum vulgare* L.) egy rövid tenyészidejű, kétsoros, tavaszi, alacsony fehérjetartalmú sörárpa fajtáján, a GK Mandolinán végeztük, mely Magyarországon 1999-ben kapott állami elismerést átlagon felüli termőképességének, kiváló általános alkalmazkodó képességnek és szárazságtűrésének köszönhetően. A fajta abiotikus stressztűrő képességének proteomikai vizsgálatai ezidáig szárazságra (Horváthné Szanics 2007), rövid idejű hőstresszre és eltérő termesztési körülményekre (Süle 2004, 2008) terjedtek ki a levélcsírán és szemtermés szintjén. Kadmiumra nézve eddig főként antioxidáns enzimkapacitás és detoxifikáló metabolitok szintjén vizsgálták a fajta tűrőképességét (Hegedűs *et al.* 2001, Jócsák *et al.* 2010). A magvak a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft. táplánszentkereszti Növénynemesítő Kutató Állomásáról származtak.

#### 4.1.2. Növénynevelés

A vetés előtt a szemterméseket búza esetében 3 %-os  $H_2O_2$ -ban, árpánál pedig 3%-os nátriumhypoklorittal (háztartási hypo-ból hígítva), 5 percig kevertetve fertőtlenítettük, majd 6-10-szeri, kimerítő desztillált vizes öblítés után vízben duzzasztottuk 1,5-2 órán át.

A referenciatérképezésre előkészített 'Chinese Spring' búzamagvakat steril talajba vetettük (komposzt (pH 7), tőzeg és perlit 6:1:1 arányú autoklávozott keveréke), 1-1,5 cm-es talajtakarással. A csíráztatás 21-23 °C-on, sötétben zajlott 3 napig, majd a csíranövények nevelését 19 °C-on, 14 óra fény / 10 óra sötétperiódus szerint, klímakamrában végeztük.

A rozsdafertőzésre szánt 'Thatcher', és Lr1 ill. Lr9 búzamagvak vetése szintén sterilizált, alginit tartalmú általános virágföld keverékbe (T-Mix-Ker Kft) történt. A csíráztatás 3 napig 21-23 °C-os sötétben, majd a nevelés átlagosan 20 °C-on és 16 óra fény / 8 óra sötétperiódus szerint, üvegházi körülmények között zajlott.

A nehézfém kezeléshez választott Mandolina árpafajta sterilizált szemterméseit csíratálba vetettük, és 3 napos, desztillált vizes csíráztatást követően, a közeget az 5. naptól ½ Hoagland-tápoldatra cserélve, 16 h fény / 8 h sötétperiódusnak megfelelően, 21 °C-os klímakamrában neveltük a hidropónikus kultúrában növekvő csíranövényeket.

# 4.1.3. A stresszkezelések kivitelezése

# 4.1.3.1. A búza levélrozsda-fertőzése

A búza inokulációt megelőző csíráztatását és fertőzését az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében Dr. Manninger Sándorné, a Kórélettani Osztály tudományos főmunkatársa végezte, a búza levélrozsda (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) 43722 patotípusával, mely jelenleg a hazai levélrozsdaállomány egyik domináns patotípusának tekinthető (Kőmives 2006). Ez a patotípus az Lr1 és Lr9 vonalak csíranövényeiben hiperszenzitív típusú rezisztenciát (9. ábra) vált ki, míg a fogékony Tc fajtában kompatibilis kölcsönhatás kifejeződését teszi lehetővé.

A csíranövények első levelét 7 napos korban ~7 x 10<sup>5</sup> uredospóra / ml koncentrációjú, 1 %-os keményítőt is tartalmazó szuszpenzióval inokulálták (az átlagos, természetes sporulációs kitettséget meghaladó spóra-töménységben), a kontroll növények mock-fertőzése pedig spóramentes keményítő szuszpenzióval történt. Ezután a növényeket 14-17 fokon, 100% páratartalom mellett, sötétben inkubáltuk 12 órán keresztül.

A kísérletben felhasznált növények nagy száma miatt a három, közel izogén búzavonal fertőzését nem tudtuk egy időben kivitelezni. Az Lr9 rezisztens és a Tc fogékony fajtát 2005. augusztusában

ill 2007. januárjában fertőztük, az Lr1-Tc genotípus párosának kezelésére pedig 2007. júliusában és 2004. augusztusában került sor. Vonatkoztatási alapunk mindkét esetben a 'Thatcher' (Tc) fogékony fajta volt, hogy a kísérleti körülmények esetleges eltérései ne befolyásolhassák az eredmények összevethetőségét. A növények fertőzését követően megjelenő rozsda-uredopusztulák illetve HR-foltok képét és számát a 9. ábra tartalmazza. Mindebből a fertőzések hatékonyságának megközelítő állandóságára következtethettünk.



9. ábra: A levélrozsda-fertőzés (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) morfológiai tünetei (a) fogékony Thatcher búzafajtán és (b) a rezisztens (Lr1 és Lr9), közel izogén genotípusokon az Lr9 példáján, 7 nappal az inokulációt követően. A mesterséges fertőzések hatékonyságának megközelítő állandóságát az inokuláló spóraszuszpenzió standardizált koncentrációja (7x10<sup>5</sup> spóra/ml) mellett a fertőzéssel társíthatóan kifejlődő, morfológiai képletek intenzitásának (az uredopusztulák vagy hiperszenzitív léziók számának) ellenőrzésével is teszteltük (a szakasz 0,4 cm-t jelöl).

# 4.1.3.2. A kadmium-kezelés árpán

A kadmium-kezelést a vízkultúrán nevelkedő 10 napos árpa csíranövényeken 0-10-50-100-300 μM CdCl<sub>2</sub> koncentrációban végeztük, a nehézfémsó vizes, 100 mM töménységű törzsoldatát megfelelő arányban a tápoldathoz keverve.

# 4.1.4. Mintavétel

A búza referencia apoplaszt vizsgálatára a 7-8 napos 'Chinese Spring' csíranövények első, frissen kifejlett levelét használtuk fel.

A búza-levélrozsda hatásvizsgálatához a Tc, Lr1 és Lr9 csíranövények első, fertőzött illetve kontroll (mock-fertőzött) leveleiből a fertőzést követő egy héten keresztül vettünk mintát, a fertőzést követő első 12 órában 2-2,5 óránként (h.p.i. = hours post inoculation), majd 7 napon át naponta (d.p.i. = day post inoculation).

A kadmiummal kezelt árpa csíranövényekből a nehézfémsó tápoldatba keverését követő egy héten át, az 1., 4. és 7. napon vettünk levélmintát.

Az apoplasztfolyadék kivonására szánt leveleket az aratás után közvetlenül, minden alkalommal frissen használtuk fel, míg az mRNS izolálásra szánt leveleket, analitikai pontosságú tömegmérést és folyékony nitrogénes gyorsfagyasztást követően, -20°C-on tároltuk felhasználásig.

# 4.2. Reagensek

A kísérlet során használt legtöbb vegyszerünk a Reanal Kft. (Magyarország), molekuláris biológiai reagenseink pedig a Fermentas International Inc. (Litvánia) termékei voltak, az eltéréseket a megfelelő helyen külön jelöljük.

# 4.3. Fehérje-szintű vizsgálatok

#### 4.3.1. Apoplaszt fehérjék (ICF) kinyerése

Az apoplaszt folyadék (intercellular washing fluid, ICF) kinyerése vákuum-infiltrálással, Rohringer és mtsai (1983) nyomán, módosítva történt.

A fehérjék egy- és két-dimenziós proteomikai elválasztására szolgáló apoplaszt folyadék kivonására jéghideg, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) és 1 mM PMSF (Sigma) infiltráló puffert használtunk, míg az enzimaktivitás mérésekhez magasabb pufferkoncentrációt, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)-t és 1 mM PMSF-t alkalmaztunk. Egyébként mindkét esetben azonos módon jártunk el.

A levágott, lemért és megmosott (2x DV, 1x MQ) leveleket finoman, U-alakban meghajlítva, tiszta üvegbottal a jéghideg infiltráló puffert tartalmazó, 50 ml-es centrifugacsövekbe csúsztattuk, úgy, hogy a puffer teljesen elfedje őket. A csöveket jéggel töltött főzőpohárba állítottuk és 6 percre vákuum alá (1 mbar - (Rotary) High Vacuum Pump E2M80, *Edwards*) helyeztük, majd a szelepet fokozatosan kiengedve, lassan (kb. 2 percet hagyva) szüntettük meg a vákuumot. Az így infiltrálódott leveleket szűrőpapíron óvatosan leitattuk, majd az ICF kinyeréséhez szitaszövetbe tekerve injekciós fecskendő hüvelyébe csúsztattuk, és centrifugacsövekbe helyezve centrifugáltuk (Universal 30 RF, *Hettich* - 2000 rpm, 20 perc, 4 °C). A cső alján összegyűlt folyadékot Eppendorfcsőbe pipettáztuk át, és az esetleges üledék eltávolítása céljából ismét centrifugáltuk (14000 rpm, 20 perc, 4 °C). A kapott felülúszóhoz 1/100 térfogat arányban proteáz-inhibitor koktélt (Complete Mini, EDTA-free, *Roche*) adtunk. A gélelektroforézis alapanyagául szolgáló mintákban a fagyasztás előtt szilárd urea (*Merck*) hozzáadásával 8 M-ra állítottuk be az urea koncentrációt.

Az ICF kivonása során a minták kezelése végig hideg körülmények közt, jégen ill. +4 °C-on, hidegszobában zajlott, az elkerülhetetlenül fellépő szöveti sérülések okozta fehérje degradáció minimálisra csökkentése érdekében.

A kinyert mintákat –80 °C-on tároltuk felhasználásig. Analízis előtt ismét lecentrifugáltuk (14.000 RPM, 4 °C, 20 perc), és a felülúszóval dolgoztunk tovább.

# 4.3.1.1. A fehérjemennyiség meghatározása

Kis térfogatú (10-15  $\mu$ l/0,1 g levél), viszonylag híg (0,3-0,8  $\mu$ g/ $\mu$ l) apoplasztkivonataink fehérjekoncentrációjának mérését Lowry (1951) szerint, illetve 2-D Quant kittel (Amersham Biosciences) végeztük, mely kis fehérjemennyiségek (0-50  $\mu$ g) csekély térfogatban (0-50  $\mu$ l) történő mérésére kiválóan alkalmas, és egyebek mellett a proteomikai mintákban gyakori, nagy koncentrációjú kaotróp ágensek (urea, tiourea) és egyéb, pl. redukáló vagy detergens komponensek és amfolitok zavaró hatását is képes kiküszöbölni, amelyek standard (festékkötésen vagy rézion redukálásán alapuló) fehérjeméréses protokollokban jellemzően interferálnak (Berkelman 2008).

# 4.3.1.2. Az apoplasztfolyadék koncentrálása

A két-dimenziós gélelektroforézishez a kivont ICF 6-10x-esére koncentrált oldatát ( $C_{feh}$ : 1,8-3,2 mg/ml) használtuk, melyet egy, a 9 kDa-t meghaladó méretű fehérjéket feldúsító, Icon Concentrator 9 CO (Pierce) molekulaszűrővel, a híg, 0,3-0,9 mg/ml töménységű apoplaszt-kivonat centrifugálása útján állítunk elő (4500 rpm, 30-40 min, 4 °C).

#### 4.3.2. Proteomikai analízis

#### 4.3.2.1. Az apoplaszt-fehérjék elválasztása

Az ICF fehérjéinek analíziséhez a tömegspektrometriai azonosítást megelőző, gél-alapú szeparációt alkalmazó proteomikai eljárást választottuk.

#### 4.3.2.1.1. Egydimenziós, denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézis (1D-PAGE)

A fehérjeminták egy dimenziós, molekulatömeg szerinti szeparálását a proteomikai analízisek kezdeti, közelítő szakaszában alkalmaztuk. Az elválasztást redukáló körülmények közt, denaturáló, Laemmli-féle diszkontinuus rendszerben (12,5 %-os szeparáló + 5 %-os tömörítő PA gél) végeztük

(Laemmli 1970), az alábbi megjegyzésekkel: A proteomikai analízisekhez a gélre 20-30 µg/zseb fehérjetartalmú mintát vittünk fel. A mintafelvitelt megelőzően a proteomikai azonosításra szánt apoplaszt fehérjemintáknál nem végeztünk efféle hődenaturálást, hogy a tömény urea tartalmú közegben megelőzzük a fehérjék N-terminális illetve a Lys-oldalláncainak tömegspektrometriai azonosítást nehezítő, esetleges karbamoilálódását. Vonatkoztatási alapként az alábbi, kis molekulatömegű (LMW) standard-elegyek szolgáltak: 10-200 kDa: Page Ruler<sup>™</sup> Protein Ladder ill. 20-120 kDa: Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). A futtatást feszültségszabályozott rendszerben, 20 °C-on végeztük (60 V - 15 min, majd 120 V - 6,5 h), a brómfenol-kék (BPB) festékfront kifuttatásáig.

#### 4.3.2.1.2. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)

A minták két fázisú, izoelektromos pont és molekulatömeg szerinti proteomikai szeparálásához 60 ill. 120 µg (analitikai) továbbá 300 µg (félpreparatív analízis) összfehérje tartalmú, koncentrált apoplaszt kivonatot használtunk.

#### 4.3.2.1.2.1. Izoelektromos fókuszálás (IEF - 1. dimenzió)

A fehérjék szolubilizálása céljából a hidrofób fehérjékre is ajánlott, Rabilloud-féle mintapuffert (Rabilloud, 1998) alkalmaztuk: 7 M tiourea (Merck), 2 M urea (Merck), 4 % CHAPS (Merck), 1 % (65 mM) DTT (Sigma) és 0,5-2 % megfelelő pH-jú hordozó amfolit/IPG puffer (AP). Előkészítésként rehidrációval egybekötött, passzív mintafelvitelt (12-14 h) végeztünk a 7, 13 illetve 18 cm-es, 3-10 NL immobilizált pH-gradienst (IPG) tartalmazó géleken (Immobiline DrySrip – Amersham Pharmacia Biotech), amelyek széles kémhatás-tartományt fednek le, és az enyhén savas 4.5-6,5 pH régióban nagyobb felbontást adnak. Az izoelektromos fókuszálást (20 °C, 50  $\mu$ A/strip) a levérozsda-fertőzés modellezésénél Multiphor<sup>TM</sup> II (AP) rendszerben kiviteleztük, a gyártó ajánlásait is figyelembe véve, az alábbi program szerint: 300 V – 0,5 h; 1000 V – 1 h; 3500 V – 1 h (gradiens), 3500 V – 3 h (step-and-hold);  $\Sigma$ : 15 kVh), míg a kadmiumstressz analíziséhez az Ettan IPGphor II készülék (AP) állt rendelkezésünkre (250 V - 20 min (gradiens), 8000 V – 2 h (gradiens), 8000 V – 3 h (step & hold) program alkalmazásával). A referencia apoplaszt vizsgálatához mindkét rendszert volt alkalmunk tesztelni (Multiphor II -  $\Sigma$ : 26 kVh; Ettan IPGPhor -  $\Sigma$ : 28 kVh).

#### 4.3.2.1.2.2. A minták ekvilibrálása

Az izoelektromos pontjuk szerint szeparált fehérjék második dimenzió előtti, ismételt redukálása és alkilálása céljából az IPG csíkokat előbb 1 % DTT-t (Sigma), majd 4 % jódacetamidot (Sigma) tartalmazó ekvilibráló pufferben (6 M urea, 30 % (w/v) glicerol és 2 % (w/v) SDS tartalmú 50 mM Tris-HCl, pH 8.8 oldatban rázattuk 20-20 percen át.

#### 4.3.2.1.2.3. Denaturáló PA-gélelektroforézis (SDS-PAGE – 2. dimenzió)

Az ekvilibrálást követően a fehérjéket Protean II xi kamrában (Bio-Rad) redukáló körülmények között, denaturáló Laemmli-féle rendszerben a 4.4.1 pontban foglaltakhoz hasonlóan méretük szerint is elválasztottuk (Laemmli, 1970), az IPG-csíkok rövid mosása, új (1,5 cm vastag, 12,5 % szeparáló PA) gélfelszínre illesztése és 1 % agarózos felürétegzése után, a következő protokoll szerint: 1-1 órán át 12 majd 24 mA/gél, végül 90 V (konstans). A futtatás a 17 °C-ra hűtött közegben megközelítőleg 14 óráig tartott.

#### 4.3.2.1.3. A gélek festése

A proteomikai azonosításra szánt fehérjék láthatóvá tétele céljából, kvantitatív viszonyításhoz kolloidális Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 festést (Neuhoff *et al.* 1985), az érzékenyebb detektáláshoz pedig a tömegspektrometriai analízissel kompatibilis, Shevchenko-féle (1996) ezüstfestést választottuk, azzal a kiegészítéssel, hogy a gyengébb foltok kifakulásának megelőzésére az előhívás leállítását 5% ecetsav helyett 1,5% Na<sub>2</sub>-EDTA-oldattal végeztük.

#### 4.3.2.1.4. A gélek dokumentációja és a gélképek kiértékelése

A gélképeket EPSON Expression 1680 Pro (EPSON) színes géldokumentációs rendszerrel rögzítettük és vizuálisan illetve az ImageMaster<sup>™</sup> 2D Platinum v4.9 (Amersham Biosciences) képanalizáló programmal értékeltük ki. A géleket további felhasználásig +4 °C-on, PE fóliában tároltuk.

#### 4.3.2.2. Tömegspektrometriai analízis

A tömegspektrometriai azonosításra gélből kivágott foltok ill. sávok analízisét az MTA SZBK Dr. Medzihradszky Katalin vezette Proteomikai Kutatócsoportja végezte. A búza referencia-apoplaszt mintákat Dr. Szájli Emília, a levélrozsda-fertőzött búza és kadmium-kezelt árpa mintákat pedig Dr. Hunyadi-Gulyás Éva értékelte ki.

#### Az MS-analízishez használt készülékek, adatbázisok és programcsomagok

A kadmium-stresszelt árpamintákat MALDI-TOF (Bruker Reflex III) és LC-MS/MS (Thermo LCQ Fleet LC-MS/MS) ioncsapdás tömegspektrométerrel analizálták. A nyers adatok feldolgozása Mascot Distiller (ver:2.2.1.0) szoftverrel, míg a kapott csúcslistákból a megfelelő fehérjék azonosítása az NCBInr 20080718 Viridiplantae taxonómiai csoportra leszűkített fehérje-adatbázisán, a Mascot (2.2.04. Matrix Science) keresőrobottal zajlott.

A referencia búzamintákat MALDI-TOF (Bruker Reflex III) és LC-MS/MS méréssel (Agilent 1100LC XCT Plus IonTrap) analizálták. A feldolgozott tömegspektrometriás adatok lekeresése NCBInr 20070216 és NCBI dbEST [Expressed Sequence Tags, EST\_others\_20060429] adatbázisokban történt, MatrixScience (http://matrixscience.com/) és az UCSF ProteinProspector programcsomagja (http://prospector.ucsf.edu/; frissítés: 2006.02.16.) felhasználásával, ill. a SpectrumMill adatbázis szoftver (frissítés 2007.05.02.) révén.

A rozsdafertőzött búzaminták elemzése MALDI-TOF (Bruker Reflex III) valamint LC-MS (Waters LC-ESI-qTOF) ill. LC-MS/MS (Agilent 1100LC XCT Plus ion trap) tömegspektrométer készülékeken történt. A szekvencia-összevetések alapját az NCBInr 20070601 és/vagy a SwissProt 52.5 adatbázis szolgáltatta, ill. ahol nem búza, hanem rokon fehérjét adott ki a Mascot/MatrixScience kereső, ott BLAST lekeresést is végeztek a TIGR (www.tigr.org) *T. aestivum* adatbázisán.

# 4.3.3. Enzimaktivitás vizsgálatok

Enzimforrásként a 4.1. pontban bemutatott, levélrozsda-fertőzéses kísérleti növényekből (*Triticum aestivum* cv. 'Thatcher' alapú Lr1, Lr9 és Tc) a 4.3 pontban leírt módon, az enzimaktivitás méréshez alkalmazott infiltráló pufferrel kinyert és ilymódon kezelt apoplaszt folyadékot használtuk. A méréseket 3 párhuzamost alkalmazva, 2 ismétlésben végeztük.

#### 4.3.3.1. Extracelluláris endo-1,3-beta-D-glükozidáz – assay

Az extracelluláris (EC) mintákban feltételezett endo-1,3- $\beta$ -glükanázok jelenlétét enzimaktivitás méréssel és ehhez kapcsolódó vékonyréteg kromatográfiával is igazoltuk. Az 1,3- $\beta$ -D-glükanáz aktivitás méréshez laminarin szubsztrátot (Sigma), egy a *Laminaria digitata* barnamoszatból kivont 1,3- $\beta$ -D-glükán poliszacharidot használtunk, melyet előkezelésként Denault és mtsai szerint (1978) redukáltunk. Az enzimreakció során képződött redukáló cukor (mono- ill. oligoszacharid) komponensek kimutatásához a Cu<sup>2+</sup> ion redukálódásán (Fehling-reakció) és a kialakuló vörös

neokuproin/Cu<sup>+</sup> komplex detektálásán (A<sub>450</sub>) alapuló kolorimetriás módszert (Dygert *et al.* 1965) választottuk. A színreakciót, Zheng és Wozniak (1997) eljárására épülve az irányításom alatt végzett szakdolgozó, Kabai Mónika által (2008) továbbfejlesztett és apoplasztra optimalizált mikrotiter-rendszerben kiviteleztük. Az új eljárással a mikrotiter lemez-alapú glükanáz kimutatás mérési tartománya jelentős mértékben kiterjeszthető (10–600  $\mu$ M glükóz), amely így alacsony fehérjekoncentrációjú, kis térfogatú, de gyakran igen eltérő aktivitású minták együttes kezelésére is alkalmas. Az aktivitást  $\mu$ mol glükóz ekvivalens/min/g friss levéltömeg értékben kifejezve adtuk meg.

Az előbbiek szerint az ICF-ben aktivitás alapján kimutatott 1,3-glükanázok feltételezett endoglükanáz jellegét Kabai (2008) diplomamunkájában, a képződött oligoszacharidok vékonyréteg kromatográfiás kimutatásával is ellenőrizte.

# 4.3.3.2. Extracelluláris kitináz – assay

Az apoplasztikus kitináz aktivitás mérésére választott kolorimetrikus kitináz-assay kivitelezése Wirth és Wolf módszerével (1990) történt, mely szubsztrátként a kitin szolubilizált és Remazol Brilliant Violet, lila színű festékkel kovalensen kapcsolt formáját (CM-Chitin-RBV, Loewe) alkalmazza. A kimutatás alapja, hogy az enzimreakciót követően a nem degradált szubsztrát kicsapással elkülöníthető, az eredetileg szubsztráthoz kötött, majd az emésztés során felszabaduló RBV festék pedig oldatba kerülve, fotometriás úton (A<sub>550</sub>) meghatározható. Az enzimaktivitást levéltömegre normálva, és az RBV extinkciós koefficiensének (ε) hozzáférhetősége hiányában, a felszabadult festék mennyisége helyett a hasított szubsztrát tömegében: mg hasított CM-Chitin-RBV / h/ g friss levéltömeg értékben fejeztük ki. A rendszer apoplasztra történt optimalizálását (hőmérséklet, pH, E/S arány stb.) az irányításom alatt dolgozott okleveles hallgató, Rab Enikő (2008) végezte el.

# 4.4. RNS-szintű vizsgálatok

#### 4.4.1. Nukleinsav izolálás és tisztítás

#### 4.4.1.1. Teljes RNS izolálás

A teljes RNS kivonását TRIzol® reagenssel (Invitogen), Kós Péter (MTA SZBK Növénybiológiai Intézet) receptje alapján végeztük. A -20 °C-on tárolt (ld. 4.1.4 pont), 0,1 g tömegű búzaleveleket folyékony nitrogénben elporítottuk, majd 1 ml TRIzol reagenssel inkubáltuk 65 °C-on min. 3 percig vízfürdőben, időnkénti keverés mellett. A mintához 0,2 ml kloroformot adtunk, majd rövid, erőteljesen vortexelés (15 s) után szobahőmérsékleten állni hagytuk (min. 3 min) és a kicsapódott

fehérjéktől centrifugálással szabadultunk meg (14 000 rpm, 15 min, 4 °C). A maradék szennyezők eltávolítása céljából a felülúszóhoz kloroform és izoamilalkohol 24:1 arányú elegyét (0,375 ml) adtuk és vortexelés után újból lecentrifugáltuk (14000 rpm, 15 min, 4 °C). A felső fázisból az RNS-t 0,5 ml izopropanollal csaptuk ki, majd 10 percnyi állás (RT) és ülepítés (14000 rpm, 10 min, 4 °C) után, a felülúszót elöntve kétszer mostuk a csapadékot 1-1 ml 70 %-os hideg etanollal, mindannyiszor centrifugálva (14000 rpm, 10 min, 4 °C). A felülúszó elöntését követően a mosott csapadékot steril fülkében 3 percig szárítottuk, és az RNS-t 50 µl steril Milli-Q vízben, jégen tartva feloldottuk. A kinyert totál RNS-kivonat koncentrációját 260 nm-en mért elnyelése révén, UV-spektrofotométeren (UV-160A, Shimadzu) becsültük (A = 1,000  $\rightarrow$  40 µg / ml RNS), minőségét az A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>; A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> arányokból ill. agaróz gélelektroforézissel kapott mintázata segítségével ellenőriztük. A teljes RNS-kivonatokat 1 hónapig -20 °C-on, hosszabb tárolás esetén -80 °C-on fagyasztva tároltuk.

# 4.4.1.2. Totál RNS-kivonat DNS-mentesítése

A totál RNS-kivonatokban előforduló, szennyező DNS-t RNáz-mentes DNáz I enzimmel (Fermentas) emésztettük Mg<sup>2+</sup>-tartalmú reakciópufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>). A reakcióelegyet 30 percen át, 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. 0,1 g friss levélszövetből kinyert totál RNS oldatot 2 unit enzimmel kezeltünk, azzal számolva, hogy a növényanyagból ~100 µg totál RNS nyerhető ki (ennek 1-2 %-a mRNS), melyre szennyeződésként 1-2 µg DNS-sel számolhatunk.

## 4.4.1.3. DNS-mentesített totál RNS-kivonat kloroformos tisztítása

A DNáz I kezelést követően az előbbi reakcióelegyet 1:1 arányban kloroformmal extraháltuk, majd a minta vortexelést követően centrifugáltuk az enzimfehérje és egyéb szennyezők eltávolítása céljából (12000 rpm, 3 min, RT). A kloroformos extrahálást még kétszer megismételtük. A DNS- és fehérje-mentesített kivonatból a totál RNS-t 0,1 térfogatnyi 3 M Na-acetát (pH 5.2) valamint 2,5 térfogatnyi abszolút etanol hozzáadásával csaptuk ki (Ziegenhagen *et al.* 1993). Végül az újra kicsapott totál RNS végső mosása és visszaoldása érdekében a nukleinsav-izolálásnál már feltüntetett módon jártunk el. A tisztított totál RNS-kivonatokat, ismételt UV-spektrofotométeres mérést követően (RNS mennyiség- és tisztaság-ellenőrzés) -80 °C-on lefagyasztva tároltuk.

#### 4.4.2. Nukleinsavak elválasztása

# 4.4.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A nukleinsav-kivonatokat 5 % nem denaturáló poliakrilamid (PAA) gélben (30:0,8 akrilamid-biszakrilamid arány), 1x TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM bórsav; 2,5 mM EDTA (pH 8.3)) elektroforézis-puffer jelenlétében választottuk el. A futtatást követően a nukleinsavakat Sammons-Schumacher-féle ezüst-festéssel tettük láthatóvá (Sammons *et al.* 1981, Schumacher *et al.* 1983).

# 4.4.2.2. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézist a PCR-termékeink kimutatására és elválasztására alkalmaztuk, a Sambrook és mtsai (1989) által leírt módon. A mintákat 1 %-os vagy 2,5 %-os, nem denaturáló agaróz (Type I, Sigma) gélben, 1x TBE (10,8 g/L Tris, 5,5 g/L bórsav, 2 mM EDTA (pH 8.0) ill. gélből történő visszaizolálás esetén 1x TAE (4,84 g/L Tris, 1,142 ml/L jégecet, 1 mM EDTA (pH 8.0)) futtató pufferben, 120 V feszültségen futtattuk 50 percig. A nukleinsavakat etídium-bromid (Merck) ill. GelRed<sup>TM</sup> (Biotium) fluoreszcens festékanyag gélbe elegyítésével, UV megvilágítás útján tettük láthatóvá.

# 4.4.3. RT-PCR

#### 4.4.3.1. Primertervezés

Kísérleteink során a vizsgálni kívánt, indukálódó búza kitinázok és glükanázok, ill. a referencia génként választott búza ubiquitin amplifikálására az alábbi összegzésben közölt primereket terveztük (6. táblázat). A referenciaként választott ubiquitinhez viszonyítva vizsgálni kívánt kitináz és glükanáz génekre tervezett primerek esetén kettős célunk volt: egyrészt olyan oligonukleotidok azonosítása, amelyek a korábbi, proteomikai analízis során MS-alapon már azonosított egyes fehérjék mRNS-ét kellő specificitással amplifikálják, vagy épp ellenkezőleg, a búza vagy rokon gabonafélék adatbázisaiból kigyűjtött, s potenciálisan expresszált szekvenciák legnagyobb részét hatékonyan lefedve, az adott géncsoporton belül "univerzális" primerként működnek.

A kísérleteinkben használt, a 6. táblázatban szemléltetett primereket a Primer3 (URL: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/; Rozen és Skaletsky 2000), az Integrated DNA Technologies (IDT) (URL: http://www.idtdna.com; Larkin *et al.* 2007, Owczarzy *et al.* 2008), és az OligoCalc (URL: http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html; Kibbe 2007) programok segítségével terveztük meg, a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisból (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) való előzetes aminosav és nukleotid szekvenciagyűjtés alapján.

## 4.4.3.2. Reverz transzkripció (RT)

Célunk az volt, hogy az izolált, DNS-mentes RNS-ből egyszálú cDNS-t szintetizáljunk SuperScript<sup>TM</sup> II, illetve III (Invitrogen) reverz transzkriptáz enzim segítségével.

A reverz transzkripció előkészítése céljából a templát denaturálását a választott primer jelenlétében végeztük, az alábbi két út egyikén: A nem szekvencia-specifikus, poliA+ mRNS-ek kihalászását és sokszorozását célzó átíráshoz 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M oligo(dT)<sub>12-18</sub>-t vagy 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M oligo(dT)<sub>12-18</sub> + 1  $\mu$ l 100 ng /  $\mu$ l random hexamer (N6) primer kombinációját mértük össze, míg a szekvencia-specifikus cDNS-szintézishez 0,4  $\mu$ l-nyi 10  $\mu$ M koncentrációjú szekvencia-specifikus reverz primert mértük be 2,5  $\mu$ g totál RNS templáthoz. A keveréket 65 °C-on, 5 percig denaturáltuk.

Az ezt követő reverz transzkripció 1 órán át, 42 °C-on zajlott. Az előzetesen denaturált, majd 3 percre jégbe helyezett mintákhoz az alábbi komponenseket adtuk hozzá: 5x First-Strand Buffer (Invitrogen) - 5  $\mu$ l; 0,1 M DTT - 2,5  $\mu$ l; dNTP Mix (10 mM) - 0,5  $\mu$ l; SuperScript<sup>TM</sup> II (200 unit /  $\mu$ l) reverz transzkriptáz enzim (Invitrogen) - 0,15  $\mu$ l, végül 25  $\mu$ l végtérfogatra steril Milli-Q vízzel kiegészítve.

# 4.4.3.3. Hagyományos polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-t Corbett gyártmányú PalmCycler PCR-készülékben végeztük. A PCR-reakció templátjai a reverz transzkripció során nyert cDNS-ek, vagy a feltárt baktériumklónok ill. azokból izolált plazmidok voltak. A PCR-reakciót a következő reakcióelegyben kiviteleztük: 1x *DuplaTaq* reakciópuffer (Zenon-Bio), 0,2 mM dNTP keverék, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M szekvencia-specifikus primer, 1 U Dupla*Taq* polimeráz (Zenon-Bio) és 5  $\mu$ l megfelelő arányban hígított cDNS. Az alkalmazott PCR-program: I. fázis: kezdeti denaturálás (95 °C, 5 min) II. fázis: cDNS amplifikáció 30-45 cikluson át ismételve – a.) denaturáció (95 °C, 30 sec); b.) primerkötődés a primerek T<sub>M</sub> értékének megfelelő hőmérsékleten (30 sec); c.) átírás 72 °C-on (30 sec). III. fázis: záró lánchosszabbítás (72 °C, 5 min). Az így kapott DNS szakaszokat agaróz gélen, a 4.4.2.2 pont szerint elemeztük.

6. táblázat: A különböző specificitású (egyes izoformákra vagy nagyobb kategóriára tervezett) búza primerek. A klónozáshoz is kiválasztott, glükanáz és kitináz-specifikus, részlegesen degenerált primerek nukleotid sorrendje dőlten szerepeltetve. Y: C/T, S: G/C, M: A/C

	Primer név Irányultság		ultság	Specificitás	Bázissorrend	Hossz	Tm	GC
	T		<b>j</b>	-		(nt)	(°C)	(%)
UBIQITIN				specifikus	5-CACCATIGACAACGIGAAGG-3	20	53,8	50.0
	TaeUbR1		R	specifikus	5'-11GGAGGA1ACCGGAGACAC-3'	20	55,4	55.0
	TaeUbF2	F		specifikus	5'-CGAAGATCCAGGACAAGGAG-3'	20	54,1	55.0
	TaeUbR2		R	specifikus	5'-CCACACCAGCAGAAGTTTGA-3'	20	55,1	50.0
	TaeUbF3	F		búza	5'-GCATGCAGATATTTGTGAAGACC-3'	23	54,7	43.5
	TaeUbR3		R	búza	5'-CCACACCAGCAGAAGTTTGA-3'	20	55,1	50.0
	TaeUbF4	F		univerzális	5'-AAGACCCTCACCGGCAAG-5'	18	56,3	61.1
	TaeUbR4		R	univerzális	5'-AGGGTGGACTCCTTCTGGATG-3'	21	58	57.1
	TaeUbR5		R	univerzális	5'-AAGAT SAGYCGCTGCTCCTC-3'	20	57,4	57.5
KITINÁZ	TaeChiF1	F		specifikus	5'-GGGTTCTACACGTACGACCG-3'	20	56,6	60.0
	TaeChiR1		R	specifikus	5'-CCCGCCGTTGATGATATTGGTG-3'	22	58,4	54.5
	TaeChiF2	F		specifikus	5'-CCTTCTTCGGCCAGACCTC-3'	19	56,6	63.2
	TaeChiR2		R	specifikus	5'-GGTGTAGCAGTCGAGGTTGC-3'	20	57,5	60.0
	TaeChiF3	F		specifikus	5'-AGAGATAAGCAAGGCCACGTCC-3'	22	59,1	54.5
	TaeChiR3		R	specifikus	5'-CTTGTTTCCCTGCGCCGTC-3'	19	58,5	63.2
	TaeChiF4	F		univerzális	5'- <b>S</b> CCACATCTCCCACGAGAC-3'	19	55,7	63.2
	TaeChiR4		R	univerzális	5'- <b>S</b> GGTCGTCATCCAGAACCA-3'	19	55,3	57.9
GLÜKANÁZ	TaeGluF1	F		specifikus	5'-CGTGATCGGCAACAACCTCC-3'	20	58,1	60.0
	TaeGluR1		R	specifikus	5'-GAAGTAGGGGTACACGTTGGC-3'	21	57,3	57.1
	TaeGluF2	F		specifikus	5'-TCGGCCTCATCCTCGACATC-3'	20	58,2	60.0
	TaeGluR2		R	specifikus	5'-CCGTTGTTCTGGTCACGCAC-3'	20	58,5	60.0
	TaeGluF3	F		specifikus	5'-GCTTCCATGTTTGCCGTTGC-3'	20	57,7	55.0
	TaeGluR3		R	specifikus	5'-TGTCGAGGATGAGGCCGATG-3'	20	58,5	60.0
	TaeGluF4	F		univerzális	5'-TACATCTCCGTAGGCAACGAGGT-3'	23	59,8	52,2
	TaeGluF5	F		A alcsalád	5'-GCCAACGTGTACCCCTACTTC-3'	21	57,3	57,1
	TaeGluF6	F		A alcsalád	5'-CATCGGCCTCATC <b>M</b> T <b>S</b> GAC-3'	19	55	60.5
	TaeGluF7	F		B alcsalád	5'-ATCTACCCGTACCTGGCCTG-3'	20	57,8	60
	TaeGluF8	F		B alcsalád	5'-GTCCAGGACGGCTCCTAC-3'	18	55,7	66.7
	TaeGluR4		R	A, B >> C, D	5'-TGGTTGTACGTCCTCGCGTTG-3'	21	59,6	59,1
	TaeGluR5		R	univerzális	5'-CTTCTGGTTCTCGTTGAACATGG-3'	23	56,1	47,8

# 4.4.4. PCR termékek klónozása

A PCR-rel felsokszorozott cDNS-t 1 %-os agaróz gélben futtattuk meg 1x TAE pufferben. A várt, megfelelő méretű PCR-terméket UV transzilluminátor alatt kivágtuk, majd E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek) vagy NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) tisztító kitet felhasználva, a gyártó utasításait követve eluáltuk a gélből. Az így megtisztított PCR-terméket pTZ57R/T plazmidba ligáltuk az InsTAclone PCR Cloning Kitben (Fermentas) leírt eljárás szerint, 1 éjszakán át (16 h), 16 °C-on inkubálva. A reakcióelegy komponensei (10 μl-re számolva): plazmid vektor

(pTZ57R/T) - 1 μl; PCR-fragmens /tisztított/ - 5 μl; 5x ligáló puffer - 2 μl; steril, nukleázmentes Milli-Q víz - 1,7 μl; T4 DNS-ligáz (5 unit / μl) - 0,33 μl.

Az inzertes klónozó vektor konstrukcióját Escherichia coli XL1 Blue vagy JM109 kompetens sejtekbe (Inoue et al. 1990) transzformáltuk, melyet Szegő Anita bocsátott rendelkezésünkre (BCE, KeTK, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék). A -80 °C-ról felengedett, 100 ml-nyi kompetens baktériumsejthez óvatosan 5-10 µl ligált plazmidot pipettáztunk, majd fél órás jeges inkubálás után 30 másodperces hősokkot (42 °C) alkalmaztunk, s a sejteket 5 percre újra jégbe tettük, így végbement a transzformáció. A baktériumsejteket felszaporításuk céljából ezután SOColdatban (20 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 mM glükóz), 200-250 rpm-en rázatva inkubáltuk 1 órán át 37 °C-on, ezalatt kb. 2,5-szer osztódtak. A plazmidot fel nem vett baktériumok kiszűrésére ampicillines táptalajra való szélesztést alkalmaztunk, a tenyészetet egy éjszakán keresztül, 37 °C-on LBA táptalajon nevelve két eltérő koncentrációban (100 mg/L ampicillin, 10 g/L Bacto-tripton, 5 g/L Bacto-élesztőkivonat, 10 g/L NaCl, 7 g/L agar (pH 7.4), majd a transzformáns, kinőtt baktériumtelepeket kék-fehér szelekciónak (Sambrook et al. 1989) is alávetettük, a korábban IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside) és X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D galactopyranoside) dimetil-formamidos (DMF) elegyével kikent felületű lemezeken (20 mg/ml Xgal (50  $\mu$ l) + 1 M IPTG (10  $\mu$ l)).

Az inzertet hordozó, fehér baktériumkolóniák egyrészének újabb, szilárd LBA táptalajra vitele után a friss tenyészetekből a későbbiekben kolónia PCR-t (Sambrook *et al.* 1989) végeztünk, hogy a klónozó vektorba beépült szekvencia megfelelőségéről méret szinten igazolást szerezhessünk. Ehhez a kolóniákat 30 µl Milli-Q vízben, 5 percig forralva tártuk fel, és a kapott sejttörmelék centrifugálása után (12000 xg, 2 min) nyert felülúszó 2,5 µl-e szolgált a kolónia-PCR templátjaként. A reakcióelegyet a 4.4.3.3 pontban már ismertetett módon állítottuk össze, 42 °C-os primertapadással és plazmid-specifikus M13/pUC forward (5' GTTTTCCCAGTCACGAC) és M13/pUC reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC) szekvenáló primerekkel.

A kolónia-PCR során pozitív jelet adó telepekből higítással "single" kolóniákat állítottunk elő szilárd és folyékony táptalajon. Ezek leellenőrzéséhez a plazmidok izolálását GenoPrep gyöngyökkel, a gyártó (GenoVision) által megadott protokoll szerint kiviteleztük, és a PCR-t már az inszertszekvenciára specifikus primerpárral végeztük el. A megfelelő szekvenciájú inzertek jelenlétének szekvencia alapú bizonyítása után a kolóniákból -80 °C-on évekig eltartható, fagyasztott törzstenyészetet ("frozen stock") készítettünk (Sambrook *et al.* 1989).

#### 4.5. Szekvenciaanalízis

A plazmidba beépült inszert nukleotid sorrendjét az MTA Szegedi Biológiai Központjában határozták meg, ABI 3100 Genetic Analyzer szekvenáló készülék segítségével (Applied Biosystems, USA). A meghatározott szekvenciákat Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty Ltd) és Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Co.; Lu és Moriyama 2004) szoftverrel analizáltuk.

A cDNS-klónok ill. transzkriptumok és a transzlált vagy tömegspektrometiailag meghatározott aminosavszekvenciák homológia-vizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov; Altschul *et al.* 1990), és a TIGR növényi EST (TA) adatbázisát (URL: http://www.tigr.org/db.shtml) használtuk fel. A homológok összevetését a Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Co.; Lu és Moriyama 2004) szoftverrel és a Jalview 2.4.0.b2 (The Barton Group, Waterhouse *et al.* 2009) ClustalW programjával (http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2) végeztük.

Az extracelluláris lokalizáció igazolásához a SignalP 3.0 szerverét (URL: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) alkalmaztuk (Emanuelsson *et al.* 2007), a fehérjék lehetséges N- és O-glikozilációs helyek feltárásához pedig a CBS (Technical University of Denmark) predikciós szervereit (NetNGlyc 1.0 - URL: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/; és YinOYang 1.2 – URL: http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/) választottuk (Gupta *et al.* 2004, Gupta 2001, Gupta és Brunak 2002).

# 4.6. Törzsfakészítés

A szekvenciák illesztése CLUSTALW2 (Larkin *et al.* 2007) program segítségével történt, az alapbeállítások alkalmazásával. Az illesztéseket a MEGA4 programcsomag (Tamura *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2008) felhasználásával végeztük, ahol a filogenetikai fa a *Neighbour-Joining* metódussal (Saitou és Nei 1987) vagy a maximális parszimónia elvét alkalmazva készült, a nukleotidokat a Kimura-2 paraméter modellel (Kimura 1980) kezeltük, és a *gap*-ek definiálásához a *pairwise-deletion* opciót választottuk. Az egyes ágak jóságának becslésére 1000 ismétlésből álló *bootstrap* analízist (Felsenstein 1985) végeztünk, melynek százalékban kifejezett értékeit a nóduszok mellett tüntettük fel. Külcsoportot nem jelöltünk ki.

# 5. EREDMÉNYEK

# 5.1 Levélrozsda-fertőzés analízise fogékony és rezisztens, közel izogén búzavonalakon

# 5.1.1 Apoplaszt-proteomikai vizsgálatok a búza levélrozsdafertőzésével összefüggésben

A BCE Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken végzett korábbi, gél-alapú proteomikai kutatások a levélrozsda fertőzéssel asszociáltan egy 1,3-glükanáz, egy kitináz 1 és egy PR 1 fehérje korábbi megjelenését és/vagy erőteljesebb indukcióját mutatták ki az Lr1 genotípus intercelluláris folyadékában, a fogékony fajtában megfigyeltekhez viszonyítva (Pós *et al.* 2005). Doktori munkám első célja a fehérje szintű változások időbeli, érzékenyebb követése volt, valamint annak megállapítása, hogy az eredmény kiterjeszthető-e a szintén Thatcher-alapú Lr9 genotípusra is.

A mintavétel időbeli felbontásának javításával lehetőség nyílott az ICF fehérjemintázat tendenciaváltozásainak pontosabb követésére. Bár egydimenziós felbontásban a fertőzést követő első 12 óra még nem mutatott meggyőző eltérést, a napok előrehaladtával a géleken már drasztikus és a genotípusok megkülönböztetésre is alkalmas változások voltak észlelhetők, amelyeket a Tc és az Lr9 genotípusok összehasonlításával az 10. ábrán szemléltetünk.

Az MS-azonosítás alapjául szolgáló 1D-PAGE mellett, amennyiben lehetőségünk volt rá, kétdimenziós fehérje szeparációt is alkalmaztunk. Ennek hatékonyabb felbontása további, minor különbségeket is valószínűsített a kontroll és fertőzött (11. ábra), ill. az Lr1 – Tc összehasonlításban a fogékony és rezisztens minták ICF-jében. Ilyen különbségeket összkivonatban Rampitsh és mtsai (2006) nem tudtak kimutatni.

A búza ICF fehérjék pontosabb szekvenciális azonosítása érdekében analízálandó mintáinkon az SZBK Proteomikai Kutatócsoportban PSD-spektrummal kiegészített MALDI-TOF-ot illetve LC-MS/MS tandem tömegspektrometriai elemzést is alkalmaztak. Az esetleges gomba eredetű szennyeződések azonosítására az adatbázis lekereséseket utóbbi rendszertani kategóriára is kiterjesztették. A fertőzés kapcsán a három genotípus (3 ill. 5 d.p.i.) mintáiból tömegspektrometriai úton azonosított, 8 funkcionális proteincsaládba sorolható, közel 30 apoplasztfehérjét az 7. táblázat összesíti feladatkör, genotípus és méret szerinti csoportosításban, izolált gélsávjaik molekulatömeg szerinti elhelyezkedését pedig az 12.A és B ábra szemlélteti.



10. ábra: Tc és Lr9 búzavonal ICF fehérjemintázata a fertőzést követő 1-7 nap folyamán. (12,5 %-os SDS-PAGE, Ag-festés). A gélen jól követhető, hogy azonos mintatérfogatot felvive a fertőzött (fert.) Lr9 minták átlagos fehérjekoncentrációja a kontrollokénál (ko.) magasabb, és a rezisztens Lr9 genotípus intercelluláris fehérjemintázatát érintő, fertőzéssel asszociált változások az Tc-hez képest általánosságban intenzívebben jelentkeznek. A különbségként adódó molekulatömeg-régiók közt megkülönböztethetőek olyan sávok, amelyek adott időpontban eltérő intenzitással, de mindkét genotípusban jelen vannak (fekete nyilak), illetve olyan sávok is, amelyek – legalábbis a fertőzést követő egy hét vizsgálata alapján, illetve a festés érzékenységének tartományában csak az egyik vonalra tűnnek jellemzőnek (szaggatott nyilak). Tc: Thatcher (fogékony) genotípus; Lr9: (rezisztens) genotípus; ko: kontroll; fert.: fertőzött; M: molekulasúly marker; dpi: fertőzést követő napok száma.



11. ábra: Lr9 búzavonal intercelluláris fehérjemintázatának összehasonlító, 2D-PAGE proteomikai analízise kontroll (A) és levélrozsda-fertőzött (B) mintákon. A mintavétel 3 d.p.i., az elválasztás pI: ~4.2-8; M<sub>r</sub>: 13-40 kDa tartományban történt. Az eltérések túlnyomó többsége növekményként vagy újonnan megjelenő foltként jelentkezik (szaggatott ill. normál nyilak), az e/1 és f/1 kvadrát határán álló folt azonban a stresszválasszal összefüggésben egyértelműen eltűnik.


12. ábra: Thatcher búzafajta fogékony (Tc) és két, közel izogén, rezisztens (Lr1, Lr9) genotípusa intercelluláris fehérjemintázatának összehasonlító analízise (10 % és 12,5 % SDS-PAGE, CBB G-250 festés). (A) a korai válaszban - Tc és Lr1 a fertőzést követő 3. napon - Az (1.a-b): endo-1,3-béta-D-glükozidáz(ok), a (2.a-b): egy kitináz 1 protein, az (3.a-b) sávok pedig PR 1 fehérjék fertőzéssel asszociált, intenzívebb kifejeződését támasztják alá az Lr1 apoplasztjában. (B) a reakció későbbi szakaszában - Tc és Lr9 5 nappal p.i. - A Tc vonal, a kitináz 1 (2x, ill. 3x) kései indukciója mellett egy, a rezisztens vonalakban általunk nem izolált, (1,3;1,4)-béta-glükanáz (1x) fehérjét is szekretált. Az Lr9 vonal analízise ugyanakkor, a korábban említett kitináz 1 (7,8), az Lr1-ből ismert PR 1 fehérjék (10,11) és glükozidázok (3) fogékony fajtánál erőteljesebb indukálódásának igazolása mellett több 1,3-béta-D-glükozidáz izoforma ill. rokon fehérje (1,4,5,6); további PR3 kitinázok (2,7), kitin-kötő PR4 fehérjék (12), szekréciós peroxidázok (3-6); taumatinszerű fehérjék (9,10), xilanáz inhibitorok (3,6) és egy extracelluláris lipáz (2,3) jelenlétét tárta fel az ICF-ben. A tömegspektrumok több fehérje esetében igazolták a gélből a névleges tömeghez viszonyítva feltételezett és a SignalP által is becsült szignálpeptidhasadást, azaz N-vég hasított formában szekretált érett forma izolálását. (ko.: kontroll; fert./a és /b: független fertőzések mintái)

Érdekességként említhető, hogy az ICF-ben azonosított fehérjéink egyike sem bizonyult gomba eredetűnek, bár erre különösen a kompatibilis kapcsolatot fenntartó, fertőzött Tc esetében, a kolonizáló gomba jelenléte miatt számíthattunk. Rampitsch és mtsai (2006) ugyanis levélrozsda-fertőzött Thatcher-ben a 2D-géleken különbségként megjelenő 32 fehérje 78 %-át gombafehérjeként azonosították. Az érdemi eltérés hátterében az állhat, hogy míg előbbi kutatócsoport összkivonatból dolgozott, addig saját fehérjemintáink lényegében a vízoldható

intercelluláris frakcióból származtak, melynek kivonása vélhetően nem érintette a gomba hausztóriuma és a gazdanövény sejtjei közt különösen intenzív anyagcserét folytató, védettebb membrán-régiókat, így a gyaníthatóan célzottabban szekretált virulencia- ill. effektor-fehérjéket sem.

A három genotípus (Tc, Lr1 és Lr9) levélrozsdafertőzését követő 3. ill. 5. nap apoplaszt mintáinak MS szekvencia-analíziséből nyert fehérje-találatokat funkcionális csoportosításban tárgyaljuk. Elsőként azt a három fehérjecsaládot részletezzük, amelyek egy vagy több azonosított tagjának indukcióját a vizsgált három genotípus mindegyikében, vagy legalább mindkét rezisztens vonalban sikerült igazolnunk.

### Glükanázok

A három vizsgált genotípusban MS-azonosított, a rozsdafertőzéssel összefüggésben indukálódó glükanázokat a 7. táblázat foglalja össze, osztályozásukat és pontosabb rokonsági viszonyaikat a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: A levélrozsda-fertőzéssel asszociáltan kifejeződő, proteomikai úton azonosított apoplasztikus búza glükanázaink filogenetikai kapcsolatrendszere az egyszikű béta-D-glükanázok törzsfájában. (A bootstrap-konszenzus fát szomszéd-csatolásos eljárással, a MEGA4 program segítségével szerkesztettük). A filogram azt szemlélteti, hogy a rezisztens Lr1 ill. Lr9 vonalakban azonosított glükanázok (kék ill. zöld háttérrel) a heterogén endo-1,3-glükanázok közé (A alcsalád), míg a fogékony Tc vonalban indukálódó glükanáz (bordó háttérrel) az evolúciósan előbbiekből levezethető 1,3-1,4-glükanázok ágába sorolható (B alcsalád). Azonos háttérben az MS-adataink alapján egyértelműen nem megkülönböztethető fehérjék. A szaggatott, bordó nyíl az egyelőre csak az aktivitás-assay-ből és génexpressziós vizsgálatainkból feltételezhető endo-1,3-glükanáz indukciót jelzi a Tc-ben.!

Az egyszikű glükanázok Higa-Nishiyama és mtsai (2006) által felállított A-D alcsaládos csoportosítását alapul véve (13. ábra), a búzavonalaink fertőzött apoplasztjában azonosított bétaglükanázok egy kivétellel a meglehetősen diverz A-alcsaládba sorolhatók, melynek képviselői az 1,3- ill. 1,3;1,6-béta-glükánok 1,3-glikozidos kötéseit hasítják. Míg azonban a rezisztens Lr1 és/vagy Lr9 genotípusokból izolált AAY88778/AAY96422, CAA77085, CAI64809, AAD28732 és BAE96089 fehérjéink az A-család tagjai, addig a fogékony Tc fajtából izolált, (legvalószínűbben) ABB96917 fehérje, szekvenciája szerint egyértelműen az abból evolúciósan leágaztatható B-alcsaládba illeszkedik (1,3;1,4-béta-glükánok 1,4-kötéseit hasító enzimcsoport).

A ~33 kDa tömegrégióban olyan, mindkét rezisztens vonal fertőzése kapcsán erősödő festődésű sávokat izoláltunk az Lr1 (3 napos p.i.) és az Lr9 (5 napos p.i.) mintákból, amelyek a fogékony Tc megfelelő mintáiban egyaránt csekély és a fertőzésre nem változó festődést mutattak (12.A ábra/'1a,b' és 12.B ábra/'3'). Az izolált fehérjesáv tömegspektrumához egyforma mértékben illeszkedhet két, egymással közeli rokon, csak szignálpeptidjükben különböző búza beta-1,3-glucanase (AAY88778 és/vagy AAY96422) az NCBI adatbázisból, Lr1-ben max. 61,1 %, Lr9-ben 38 % szekvencia-lefedettséggel. A prekurzor N-végben fennálló egy aminosavnyi eltérésük (6. as: Phe vs. Gly) nem segíthet az azonosság tisztázásában, mert az (-).IGVCYGVIGNNLPSR.(S) nem-klasszikus triptikus peptid tanúsága szerint az ICF-ben már a szignálpeptid-mentes, érett forma van jelen.

A fertőzött Lr9 genotípus apoplasztjában (5 dpi) előbbi(eke)n kívül további négy búza 1,3endoglükanáz előfordulása és indukciója valószínűsíthető a 30-40 kD közötti molekulatömegrégióból. Ezek a 12.B ábra számozása szerint a következők: a közeli ~32 kDa régióban ['4' sáv] egy, az előbbi fehérjéktől mindössze 8 nukleotidban eltérő, s a 220. pozícióban konzervatív eltérése (Ser→Thr) révén azonosított glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (CAA77085; szekv. lef. 54 %); a ~31 kDa régióban ['5' sáv] egy putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (CAI64809; szekv. lef. 25 %), a 31-30 kDa tartományban [5-6. sáv] egy beta-1,3-glucanase precursor (AAD28732; szekv. lef. 25 %); és végül, a ~38 kDa régióból ['1' sáv] egy távolabbi homológ, endo-beta-1,3-glucanase (BAE96089; szekv. lef. 28 %).

Az Lr1-Tc pár fertőzése tárgyában előbbihez hasonló mélységű analízist sajnos nem tett lehetővé a rendelkezésünkre álló, korlátozott mintamennyiség ill. a gélek (3 dpi) felbontásának gyengébb minősége. Ennek ellenére, a 30-33 kDa mérettartomány az Lr1 rezisztens vonal stresszválaszában is intenzívebb fehérjekifejeződést valószínűsít, mely a már azonosított (AAY88778/AAY96422) 1,3- endoglükanáz(oka)t képviselő 1a-b sáv mellett egyéb fehérjékre is kiterjed (12.A ábra).

Ugyanebben a tartományban a Tc vonal fertőzött mintáiban (3 d.p.i.) az Lr1-Tc páros fertőzését összevetve nem figyeltünk meg a kontrollhoz képest fokozott fehérjeakkumulációt (12.A ábra), az Lr9-Tc sorozat ismételt kísérleteinek jobb felbontású gélein pedig, bár egyes napokon a Tc-ben is megfigyelhető volt csekély intenzitásnövekedés, a különbség gyakran nem volt reprodukálható, és annak mértéke – egy sávot kivéve – nem is érte el az Lr9-ben tapasztalt indukciós erősséget. Mindez arra utal, hogy bár a Thatcher-ben szintén lehetséges a 31-33 kDa méretű fehérjék fokozott indukciója, az a rezisztens vonal(ak)hoz képest a vizsgált időpontokban kevésbé számottevő.

Ez a jellemző változást mutató, a Tc 5 d.p.i.-s mintájában '1x'-ként jelölt sáv, méretét tekintve ugyan az Lr9 6. sávjával komigrált (12.B ábra), jelenléte azonban, a rezisztens vonalaktól eltérően csak a fertőzést követő 5-6. naptól volt bizonyítható SDS-PAGE-n. A sáv MS-analízise viszont az előzőek alapján várható, Lr9-ben izolált 1,3-glükanáz (AAD28732) helyett, Tc-ben érdekes módon endo-1,3-1,4-glükanáz(ok) indukcióját igazolta. Az MS-analizált peptidek az NCBInr adatbázisból három búza (1,3;1,4)-beta-glucanase-zal is azonos mértékű (17 %) illeszkedést mutatnak (CAA80493, CAA80492 ill. ABB96917), ezért jelenleg nem dönthető el, hogy valójában melyik fehérje indukálódik. A névleges molekulatömegek (32,1; 32,1 és 29,6 kDa) és a gélünkön azonosított MW (~30 kDa) összevetése alapján mindenesetre nem az első két, Lai és mtsai (1993) által, egészséges csírázó 'Millewa' búzafajta géntérképezése során talált fehérjével, hanem az utóbbi, konceptuális transzlációval levezetett fehérjeszekvenciával való azonosság az esélyesebb. A fehérjék valamelyikét (vélhetően a CAA80493 izoformát) egészséges 'Chinese Spring' búza apoplasztjában magunk is kimutattuk (ld. 5.3 fejezet 11. táblázat).

### Kitinázok (PR3 család)

A ~27 kDa körüli mérettartományban mindhárom vizsgált genotípus apoplasztjában sikerült kimutatnunk a gombafertőzéssel asszociáltan egy lúgos **chitinase I** búzafehérje (BAB82471) ill. homológja jelenlétét. A protein sávja az Lr1 és Lr9 vonal fertőzött egyedeiben korán, már a 2-3. napon számottevő mennyiségben indukálódott (12.A ábra/**'2 a,b' -** 29 % ill. 12.B ábra/**'7, 8'** - 42 % ill. 37 % szekv. lef.), és kissé késleltetve (4-5. nap p.i.) a fogékony Tc fajta stresszválaszában is észlelhető volt (12.B ábra/**'2x' -** 21 %, '3x' – 14 %).

A fertőzött Lr9-es vonalban két másik, szekvenciálisan a BAB82471-mal távolabbi rokonságban álló kitináz (24. ábra) jelenléte is kimutatható:

(i) Szintén a ~25-27 kDa régióban, egy chitinase II (AAD28730) ill. chitinase IV (AAD28733)
precursor-ral egyaránt homológ fehérje nyomát detektáltuk 5 nappal p.i. (12.B ábra/'7'), melynek azonosítása egy mindkét fehérjére egyformán illő (6 % ill. 5.5 % szekv. lef.), 15 as hosszúságú

triptikus peptidre alapult. A fehérje elektroforetikus mobilitása alapján azt valószínűsítem, hogy izolált fehérjénk a chitinase IV érett formájának (26,6 kDa) felel meg.

(ii) A ~35 kDa régióban, a 4. naptól p.i. egy további endokitináz fehérje expressziója bizonyítható (12.B ábra/'2'), melyhez az NCBI adatbázisában, gabonafélék köréből a rozs egy kettős funkciójú, **31.7 kDa class I endochitinase-antifreeze protein precursor**-a (AAG53609) áll a legközelebb (szekv. lef. 16 %). Az előbbire illő triptikus peptidek mindegyikének megfelelő búzahomológ viszont egyelőre nem ismert: egy Ib osztályba sorolt búza endochitinase-ban (CAA53626) a 101. pozícióban szekvenciánkhoz képest biztos eltérésként Q (Gln) helyett L (Leu) áll, egy másik chitinase I (AAR11388) és egy chitinase 3 (BAB82473) pedig, saját peptidünkhöz képest két-két eltéréssel szolgál a 197. (H $\rightarrow$ Y) és 206. (Q $\rightarrow$ R) pozíciókban.

### PR 1 fehérjék

Evolúciós szempontból a két rezisztens vonalban (Lr1, Lr9) általunk potenciálisan azonosított, s egymással >90 %-os azonosságú három PR1 fehérje a búza PR1 fehérjék szekvenciákban gazdagabb ágába sorolható, szoros rokonságban áll egyes PR1b fehérjékkel, pl. *H. vulgare* CAA52894 (Hv-8) és *T. monococcum* AAZ94266 proteinekkel, de meglehetősen távol a búza PR1.2 által képviselt ágtól.

A 15 kDa-t kismértékben meghaladó mérettartományból (12.B ábra/'3a,b' sáv), az Lr1 vonal rozsdafertőzés hatására adott stresszválaszában, 2005-ben egy PR 1 családba sorolható fehérjét mutattunk ki PSD spektrummal megerősített MALDI-TOF analízissel, mely a rezisztens vonalban már 3. d.p.i.-nél, a fogékony Tc fajtához képest korábban / intenzívebben indukálódott (Pós et al. 2005). Az azonosított peptidek ~15-20 %-át (7-et), köztük egy nem klasszikus, szekretált formára utaló triptikus peptidet (-).QNSPQDYLSPHNAAR.(A), max. 57 %-os szekvencia-lefedettség alapján, akkor egyedüli NCBI búzahomológként a pathogenisis-related protein 1.1 (CAA07473) érett formájával azonosítottuk. Az NCBI adatbázis időközben jelentősen bővült, ezért a hajdani tömegspektrumok alapján ma úgy tűnik, hogy mintánkban egy másik, közel rokon búzafehérje, a pathogenesis-related protein 1 (AAK60565) párhuzamos jelenléte is igazolható (12.A ábra/'3b' -47.6 %; '3a' - 45.7 %), amit több, előbbire is illő és három újabb, a korábban azonosított peptidekkel átfedő, de összesen 8 pozícióban is eltéréseket mutató peptid valószínűsít, és az utóbbival erősen rokonítható pathogenesis related-1 (AAP14676; '3a' - 40.4 %) is jelen lehet. Mivel azonban a két utóbbi fehérje érett formája közt fennálló egy aminosavnyi eltérés (Ser vs. Thr) régiójából csak az első két fehérjének megfelelő peptideket detektáltuk (pl. T.KLQGFAQSYANQR.I), a sávban a harmadik fehérje valószínűsége előbbieknél csekélyebb, hiszen jelenlétét eggyel kevesebb peptid magyarázza.

Az Lr9 vonalában 5 nappal p.i. végzett, hasonló vizsgálatokból szintén az előbbi két (esetleg három) PR 1 fehérje erőteljes indukciója valószínűsíthető, feltételezhetően a rezisztenciával is összefüggésben: Az Lr1-ből kivágott régióval azonos, ~15 kD-os MW tartományból izolált foltban (12.B ábra/'11' sáv) 60,4 %-os lefedettséggel a CAA07473 fehérje jelenlétét igazoltuk, míg további két, szekvenált peptid alapján, ugyanezen foltban 21,3 % ill. 22,4 %-os lefedettséggel a AAK60565 és/vagy AAP14676 fehérjék jelenléte is valószínűsíthető. A két utóbbi PR1 fehérje bármelyikére utaló triptikus peptideket a preprotein formáiknak megfelelő ~18 kDa molekulatömeg régióban (12.B ábra/'10' sáv) is azonosítottunk 20 % ill. 21 %-os szekvencia-lefedettségi biztonsággal.

A PR1.1 fehérje kapcsán furcsaságokat is tapasztaltunk: (1) A fehérje 15 kDa foltjából származó egyik peptid szignálpeptidet (SP) is tartalmazó szekvencia. (2) A 25 kD-os mérettartományból (12.B ábra/'8' sáv), a chitinase 1 proteinnel komigrálóan szintén találtunk egy, a PR1.1-re illeszkedő triptikus peptidet, amelynek (egyelőre legalábbis) nem ismert más, nagyobb molekulatömegű homológja. Mivel utóbbihoz hasonló anomália jelentkezett a PR1.1 fehérjével szembetűnő szekvenciális rokonságban álló, kadmium-stresszelt árpa apoplasztjából izolált PB1-3 (PR1b – Hv 8) protein 1D-PAGE analízisénél is, elképzelhető, hogy a látszólagos, pozitív irányú méretbeli elmozdulás a két rokon protein jelentős glükoziláltságára vezethető vissza. Ennek lehetőségét mindenesetre a NetNGlyc 1.0 szerver erősen valószínűsíti egy, mindkét fehérje 20. aminosavánál azonosított N-glikozilációs hely képében ( $Asn^{20} - (Lys^{21}) - Ser^{22}$ ).

Az eddig taglalt három, ismerten antimikrobiális proteincsalád mellett, egyelőre kizárólag az Lr9ben további 5 fehérjecsalád képviselőit azonosítottuk a stresszválasszal összefüggésben növekvő intenzitású fehérjesávokból:

### Peroxidázok

Az Lr9 mintákban a fertőzéssel összefüggésben 5 különböző peroxidáz jelenlétét sikerült kimutatnunk, az egydimenziós gélek 30-35 kDa közötti molekulatömeg-tartományában (12.B ábra/'3-6') egymással ill. glükanázokkal komigrálva. Az analizált peptidekhez 3 esetben búzahomológot is rendelhettünk: a cv. 'Biggar' fajtából izolált két peroxidase (CAA59486; ['3'] - 13 % szekv. lef.) és (CAA59485; ['5'] - 17 % szekv. lef.), továbbá a cv. 'Cheyenne'-ben leírt peroxidase precursor (WP2) formájában (Q0585; ['6'] sáv). További peroxidáz típusú, de előbbi három szekvencia egyikére sem illeszthető peptideket vizsgálva, a homológok közt legközelebbi rokonként a kenyérbúza egyik diploid őséből, *T. monococcum*-ból származó két ortológ peroxidáz gén termékeit találtuk az NCBI adatbázisban. Két egyedi peptid a peroxidase 2 (AAW52716; ['4'] - 22 % szekv. lef.) proteinnel rokon búzafehérje jelenlétére utalt, legalább öt másik peptid pedig

kifejezetten a **peroxidase 6** (AAW52720; ['4, 5'] - 23 ill. 10 % szekv. lef.) búzahomológját valószínűsítette.

Liu és mtsai (2005) a *Triticum monococcum*-ban általuk azonosított 10 különböző peroxidáz génre alapozva filogenetikai klaszterezést végeztek *Oryza* ill. *Arabidopsis* szekvenciák kiegészítő felhasználásával. Ezt a csoportosítást alapul véve úgy tűnik, hogy az Lr9 vonalban levélrozsda-fertőzéssel összefüggőnek talált 5 peroxidáz búzafehérjéink mindegyike az 1. klaszterként definiált peroxidáz-géncsoport tagjai által kódolt:

A *cluster I* egyik, **savas** peroxidázokat tartalmazó ágában helyezkedik el, a TmPRX1 gén fehérjéjével szoros rokonságban a **CAA59486** búzafehérje, valamint a TmPRX2 gén termékének (**AAW52716**) általunk izolált, **putatív búzaortológ**ja. A *cluster I* egy másik ágában, a TmPRX3 génnel mutat közeli rokonságot két lúgos jellegű búza peroxidázunk: **CAA59485** és **Q05855**. Végül, a *cluster I*-en belül egyedi, TmPRX6 gén által képviselt ágba tartozik a *T. monococcum* **peroxidase 6** fehérjével (AAW52720) ortológnak feltételezett, szintén lúgos típusú búzafehérjénk.

#### Taumatinszerű proteinek (TLP)

A ~23 kDa molekulatömeg-tartományban (12.B ábra/'9' sáv) legalább két, egymással közel rokon TLP komigrálását valószínűsíthetjük:

Ezek egyike – két triptikus peptid révén – egy árpa **TLP8** proteinnel (AAK55326) homológ (szekv. lef. 12 %). Búzában fehérje megfelelője egyelőre nem ismert, bár a peptidek a TIGR adatbázis TA68252\_4565 kódú cDNS búza klón szekvenciájában is megtalálhatóak. A foltból azonosított további öt TLP-specifikus triptikus peptid mindegyike előfordul az árpa **TLP7** protein (AAK55325) érett alakjában (26 % szekvencia lefedettséggel). A jellegzetes, két aminosavval rövidebb N-vég peptidtől (-).ATITVVNR.(C) eltekintve ugyanezek a peptidek a **Barperm1** (AAB71680) árpafehérjében is előfordulnak. A búzában talált leghasonlóbb fehérje egy ABA- és hideg-indukált **thaumatin-like protein** (AAM15877; szekv. lef. 22 %), de ennek szekvenciája csak részleges egyezést mutat, így pl. 90. aminosav pozíciójában Thr helyett biztosan Ala van.

A ~18 kDa-s mérettartományban **további két TLP** jelenléte valószínűsíthető (12.B ábra/'**10'**), mely(ek) legközelebbi búza homológjai: CAA66278 és AAK60568 (szekv. lef. 21 % ill. 7 %).

### További kitinkötő ill. kitináz fehérjék (PR4 család)

Az Lr9 vonalban a PR3 fehérjecsaládba sorolható kitinázokkal funkcionálisan rokonítható PR 4 fehérjék nyomát is sikerült kimutatnunk (12.B ábra/'**12**'). E fehérjéket doménszerkezetük alapján a kitin-analógokat gyengén kötő Barwin szupercsaládba sorolják. Az izolált mérettartomány (13-14

kDa) és a szekvenált 6 triptikus peptid szekvenciája alapján mintánkban legalább három, közel rokon fehérje lehet jelen:

4 peptid révén (szekv. lef. 39 %) egy 14 kD nagyságú **pathogenesis-related protein-**nel (2209398A), ill. a **wheatwin-2 precursor** (O64393) érett, SP-mentes alakjával találunk homológiát (szekv. lef. 33 %), míg 3, előbbivel csak részben egyező peptid a **wheatwin-1 precursor** (O64392) érett, SP-mentes formájával mutat hasonlóságot (szekv.lef. 15-20 %). Megjegyzendő, hogy az MSanalizált peptidek egyike nem klasszikus triptikus peptid: (-).QQATNVR., s a végén talált Glu  $\rightarrow$  pyro-Glu módosulása szintén az apoplasztba szekretált forma izolálására utal. Két további, az előbbiektől eltérő peptid alapján végül 18 % szekvencia lefedettséggel egy harmadik, a **wheatwin5, putative vacuolar defense protein**-nel (AAS78780) rokonítható PR4 fehérje megjelenése is valószínűsíthető a fertőzött Lr9 mintában.

### Extracelluláris lipázok

Előbbieken kívül, egy GDSL-szerű extracelluláris lipáz megjelenése is bizonyítható a ~35-38 kD-s tartományban, az endokitinázzal ill. egy endoglükanázzal és peroxidázokkal komigrálva (12.B ábra/'2, 3'), melynek legközelebbi homológját árpában találtuk: UCW116, putative lipase (ABL11233); 12.B ábra/'2' - 6 %; '3' - 16 % szekv. lef.). Búzában az EMBL adatbázisban még nem ismert az analizált peptidekkel nagy hasonlóságot mutató fehérje, de a TIGR adatbázis egy cDNS klónjából (TA59836\_4565) transzlált búza fehérjeszekvencia nagy hasonlóságot mutat, bár a szekvencia azonosság nem teljes (286. pozícióban Glu  $\rightarrow$  Arg csere).

7. táblázat: A levélrozsda-fertőzött Thatcher, Lr1 és Lr9, közel izogén búzavonalak apoplasztjában tömegspektrometriailag azonosított fehérje homológok összefoglaló táblázata (ill.: az egyaránt valószínű, pl. (közel) azonos szekvenált peptidekkel és hasonló szekvencia-lefedettséggel illeszkedő homológok. A megadott Mr-érték a homológ NCBI fehérje-adatbázis szekvenciájából kalkulált névleges tömeg, amely a szekretált formák gélbeli mobilitásával gyakran nem egyező, és éretlen, szignál-peptides formát is jelölhet; n.é: nem értelmezhető)

			SZEKVENCIA LEFEDETTSÉG (%) A MEGFELELŐ GÉLSÁVBAN (no. az 16.A és B ábrán)																					
	PROTEIN HOMOLOGOK	ACCESSION no.	M <sub>r</sub> (Da)	Tc			Lr1			Lr9											TAXON	REFERENCIA		
				1x	2x	3x	1A	2A	3A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
	beta-1,3-glucanase ill.	gi 68250406/ AAY88778	35 386				61%					38%										T. aestivum	Cui S. & Kang Z. (unpub.) Dudler R. (unpub.) Abderhalden O. & Dudler R. (unpub.) Li et al. (2001) Higa-Nishiyama et al. (2006) Wang H.Y., Yang W.X. & Liu D.Q. (unpub.)	
	beta-1,3-glucanase	gi 68349051/ AAY96422	35 356																			T. aestivum		
R2)	glucan endo-1,3-beta-D- glucosidase	gi 3757682/ CAA77085	35 448										54%									<i>T. aestivum</i> cv. '75141'		
IÁZ (PI	putative glucan endo-1,3-beta-D- glucosidase	gi 61657664/ CAI64809	34 253											25%								<i>T. aestivum</i> cv. '75141'		
GLÜKAN	beta-1,3-glucanase precursor	gi 4741846/ AAD28732	34 917											21%	x%							<i>T. aestivum</i> cv. 'Sumai 3'		
	endo-beta-1,3-glucanase	gi 109150348/ BAE96089	36 187							28%												<i>T. aestivum</i> cv. 'Norin 61'		
	(1,3;1,4) beta glucanase	gi 83031478/ ABB96917	31 500	17%																		T. aestivum		
33)	chitinase 1	gi 18146825/ BAB82471	27 458		21%	14%		29%								42%	37%					T. aestivum	<i>Kawakami A. &amp; Yoshida M.</i> (unpub.)	
ÁZ (PF	31.7 kDa class I endochitinase- antifreeze protein precursor	gi 12407647/ AAG53609	34 584								12%											<i>S. cereale</i> var. 'Musketeer'	Yeh et al. (2000)	
KITIN	chitinase IV precursor	gi 4741848/ AAD28733	29 026													6%						<i>T. aestivum</i> cv. 'Sumai 3'	<i>Li et al.</i> (2001)	
PR1	pathogenisis-related protein 1.1	gi 3702663/ CAA07473	17 651						57%											60%		T. aestivum cv. 'Kanzler'	<i>Molina A. et al.</i> (unpub.)	
	pathogenesis-related protein 1	gi 14334165/ AAK60565	17 537						55%										20%	21%		S. cereale	Yu L. et al. (unpub.)	
	pathogenesis related-1	gi 30144637/ AAP14676	16 752						50%										21%	22%		T. aestivum	<i>Ray et al.</i> (2003)	

## 7. táblázat (folyt.):

	SZE								SZEKVENCIA LEFEDETTSÉG (%) A 12.B ÁBRA MEGFELELŐ SÁVJÁBAN															
	PROTEIN HOMOLÓGOK	ACCESSION no.	M <sub>r</sub> (Da)		Tc		Lr1						Lr9									TAXON	REFERENCIA	
				1x	2x	3x	1A	2A	3A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
	Peroxidase (TmPRX 1 homológ)	gi 732974/ CAA59486	30 463									13%										<i>T. aestivum</i> cv. 'Biggar'	<i>Båga et al.</i> (1995)	
(PR9)	peroxidase 2 (TmPRX2)	gi∣57635149/ AAW52716	33 386										22%									T. monococcum	<i>Liu et al.</i> (2005) <i>Liu et al.</i> (2005)	
XIDÁZ	peroxidase 6 (TmPRX6)	gi 57635157/ AAW52720	35 260										23%	10%								Т. топососсит		
PERO	Peroxidase (TmPRX3 homológ)	gi 732972/ CAA59485	33 113											17%								<i>T. aestivum</i> cv. 'Biggar'	<i>Båga et al.</i> (1995)	
	peroxidase precursor (WP2) (TmPRX3 homológ)	gi 730298/ Q05855	32 382												X%							<i>T. aestivum</i> cv. 'Cheyenne'	Hertig et al. (1991)	
PR5)	thaumatin-like protein TLP8 ill.	gi 14164983/ AAK55326	25 213															12%				H. vulgare	Reiss és Horstmann (2001)	
R.	TA68252_4565 (transcript assembly)	- (TIGR)	n.é.																	_		T. aestivum		
RŰ P	thaumatin-like protein TLP7 ill.	gi 14164981/ AAK55325	23 644															22% ill				H. vulgare	<i>Reiss és Horstmann</i> (2001)	
NSZE	Barperm1	gi 2454602/ AAB71680	22 554																			H. vulgare	<i>Skadsen és Herbst</i> (unpub.)	
UMATI	thaumatin-like protein	gi 1321999/ CAA66278	18 391																21%	, 0		T. aestivum	<i>Mingeot és Jacquemin</i> (1998)	
TAI	thaumatin-like protein	gi 14334171/ AAK60568	17 588																7%	,		T. aestivum	<i>Yu et al.</i> (unpub.)	
â	pathogenesis-related protein	gi 1588926/ 2209398A	14 013																		39%			
2 (PR 4	Wheatwin-2 precursor (PR4b)	gi 34925032/ O64393																			ill. 33%	T. aestivum	<i>Caruso et al.</i> (1996)	
ITINÁZ	putative vacuolar defense protein - wheatwin 5	gi 45862004/ AAS78780	18 181																		18%	<i>T. aestivum</i> cv. 'S. Pastore'	Bertini et al. (2006)	
X	Wheatwin-1 precursor (PR 4a)	gi 34925030/ O64392	16 024																		15%	T. aestivum	Caruso et al. (1996)	
۶ÁZ	UCW116, putative lipase ill.	gi 118748148/ ABL11233	38 826								< 6%	< 16%										H. vulgare	Van et al. (2006)	
LP	TA59836_4565 (transcript assembly)	- (TIGR)	n.é.								0 /0	10 /0										T. aestivum	ran et al. (2000)	

### 5.1.2 Apoplasztikus enzimaktivitás vizsgálatok eredményei

A proteomikai eredmények megerősítésére és kiegészítésére az endo-1,3-glükanázok és a kitinázok esetén enzimaktivitás méréseket is végeztünk. A levélrozsda-fertőzésre fogékony ill. rezisztens búzavonalak apoplasztjának összehasonlítására olyan enzimkivonatokat használtunk fel, amelyek - a nagy mintaszám kezelési nehézségei miatt - egymástól független kísérletekből származtak a Thatcher alapfajta két közel izogén, Lr1 és Lr9 rezisztens vonala esetében. A kísérletek körülményeiben esetlegesen fellépő eltérések ellenőrzése céljából a fertőzéseket mindkét esetben a megfelelő fogékony (Tc) genotípussal párba állítva végeztük.

A mintavétel az első 12 órában 2-2,5 óránként, majd 7 napig naponta történt. Eredményeinket a 14. ábrában összesítettük.

### 5.1.2.1 EC endo-1,3-glükanáz assay eredményei

Az analízis módszertani adaptálásának eredményeit, a mérés optimalizálását és kivitelezését Kabai Mónika (2008) irányításom alatt végzett szakdolgozata tárgyalja. Az ott leírt eredményeket itt csak röviden foglalom össze, hogy a fehérjeanalízis eredményeivel és a következő fejezetben tárgyalt transzkripciós analízisekkel való összevetés lehetővé váljon. Ugyanezt a célt követem az 5.1.2.2 fejezetben a kitináz aktivitás vonatkozásában.

Az enzimatikus karakterizálás részeként meghatározott pH optimum (4.8-5.5) vonatkozásában a három genotípus egységesnek mutatkozott. A végső analíziseket pH 5.4-en végeztük.

Az általunk vizsgált 1,3-glükanázok a fertőzést követően mind a Tc-Lr1, mind a Tc-Lr9 összehasonlításban, kezdetben közel azonos aktivitással jelentkeztek a két rezisztens és a fogékony vonalban, és az aktivitás emelkedésében tükröződő indukciójuk fehérjeszinten 8-10 órával a fertőzés utánra tehető. A későbbi aktivitásnövekedés a rezisztens vonalakban szembetűnően nagyobb, a 'Thatcher' fajtához képest 2,5–4-szeres, és maximumát kb. a fertőzés után négy-öt nappal éri el. Hasonló időpontra esik, bár kisebb az aktivitási csúcs a pár órával korábban reagáló, levélrozsda-érzékeny Tc fajtánál is, amelyben a maximum elérése (3-4. dpi) után megkezdődik az enzimkoncentráció folyamatos lassú visszatérése is a kiindulási állapothoz. Ezzel ellentétben, a rezisztens fajtáknál a fertőzés utáni 7. napig csak kismértékű aktivitáscsökkenés figyelhető meg (14.A ábra).



14. ábra: A gomba eredetű sejtfalat bontani képes, intercelluláris (A) béta-1,3-glükanáz és (B) kitináz enzim aktivitás indukciós dinamikája a Thatcher (Tc) búzafajtában és két közel izogén, Lr1 és Lr9 vonalában, a levélrozsdafertőzést követő egy hét folyamán. Az egészséges (7. naposan mock-fertőzött) csíranövények normál élettani fejlődésének második hetében sem a fogékony 'Thatcher', sem pedig a rezisztens Lr1 és Lr9 vonalak nem mutatnak számottevő 1,3-glükanáz ill. kitináz aktivitást az apoplasztban. A genotípusok közt aktivitásukban és indukálódásuk dinamikájában fennálló különbségeket a levélrozsda-fertőzés hozza felszínre. (A): Az intercelluláris béta-1,3-glükanáz aktivitás mindhárom vonalban indukálódik a fertőzéssel összefüggésben, de az Lr1 és az Lr9 rezisztens vonal értékei a fertőzést követő 2-3. napon beérik, majd elhagyják a korán reagáló, fogékony Tc aktivitásszintjét, és egy második, előbbinél jóval intenzívebb aktivitás csúcsot mutatnak a 4-5. nap (p.i.) környékén. A fogékony Tc vonal ezzel szemben még a 3-4. napon (p.i.) eléri jóval enyhébb aktivitási maximumát és lassan ereszkedik vissza kiindulási szintjére. (B): A szekretált kitináz aktivitás szintén indukciós profillal jellemezhető mindhárom genotípusban. A Tc korai (10. óra p.i.) válasza egy 1. napos (p.i.), szerényebb plató elérését követően egészen a 4. napig (p.i.) fennmarad, és csak ezután kezd lassan csökkenni. A rezisztens vonalak kitináz válaszai kezdetben lassabban indukálódnak, de legkésőbb a 2. napot (p.i.) követően biztosan elérik a Tc szintjét, és egy hét alatt olyan intenzív, 2 (Lr1) ill. 3 (Lr9) hullámú indukciós sorozatot fejeznek ki, amelyben aktivitás maximumuk a fogékony válasz intenzitásának legalább 2,5-szeresét éri el. A kísérletek körülményei közt egyelőre ismeretlen és nehezen kontrollálható eltéréseket valószínűsítünk, melyek a júniusban (Tc-Lr1) és januárban (Tc-Lr9) fertőzött Tc minták csekély aktivitáskülönbségeiben tetten érhetők.

Az Lr1 és az Lr9 rezisztenciagént hordozó búzavonalak apoplasztikus 1,3-glükanáz aktivitását összehasonlítva úgy tűnik, hogy indukciójuk némileg eltérő időzítésű ill. mértékű. Amíg az apoplasztikus 1,3-glükanázok indukciója az Lr1-ben kissé korábbi időpontban ill. nagyobb eréllyel indul meg (2. dpi), majd magasabb aktivitásértékben csúcsosodik a 4. napon (p.i.), addig az Lr9-ben ez a válasz egy kissé lassabban (3. dpi) indul be és kisebb intenzitással, kb. az 5. napra éri el maximumát. A későbbiekben, a 6-7. napra (p.i.) azonban mind az Lr1, mind pedig az Lr9 endo-1,3-glükanáz aktivitásgörbéje közel azonos értéket ölt. Mivel ismételt kísérletekben hasonló tendenciák mutatkoztak, lehetséges, hogy az aktivitásnövekedés kinetikájában megfigyelt eltérés valós. Mivel azonban a 14.A ábrán bemutatott Tc-Lr1 és Tc-Lr9 fertőzéses kísérletekben a Tc vonal 1,3-β-D-glükanáz aktivitásában is megfigyelhetők időbeli eltolódások, lehetséges, hogy a mérési vagy kísérleti hibából eredő ingadozásokról van szó.

### 5.1.2.2 EC kitináz assay eredményei

A kitináz aktivitásmérés ICF-re való optimalizálását és az assay kivitelezését irányításom alatt Rab Enikő (2008) szakdolgozónk végezte, diplomamunkája részeként. A tág kémhatás-tartományban (pH 3.2-10.2) végzett vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a fertőzött ICF-ben igen széles pH intervallumban (pH: 4.3-7.8) aktív kitináz formák vannak jelen, de a három genotípusban az aktivitások kémhatás függése kissé eltérő. Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében méréseinket pH 7.0-n kiviteleztük (14.B ábra).

Az apoplaszt kémhatása normál körülmények közt többnyire stabilan pH 5-6.5 értékeken belül mozog (Gao *et al.* 2004, Felle 1998, Grignon és Sentenac 1991). Egyes régiókra, pár sejtcsoportra kiterjedően azonban jelentős lokális pH-eltérések (pH: 5.7 - 7.0) is mérhetőek (Kosegarten, 1999), és bizonyos abiotikus vagy biotikus stresszhatásokra enyhébb vagy drasztikusabb fokú (pl. rozsdavagy *Fusarium* fertőzés hatására jellemzően, pH $\rightarrow$  7.2-7.3), célzott ellúgosodás is felléphet (Gao *et al.* 2004, Tetlow és Farrar 1993, Fukuda 1996, Aleandri *et al.* 2008). A lúgosodás növényi sejtkultúrákban gomba eredetű elicitorok hozzáadásával is kiváltható (Fukuda 1996, Tripathy *et al.* 1999), melyet követően Fukuda (1996) épp lúgos I és savas II osztályú kitináz RNS-ek expresszióját figyelte meg. Aleandri és mtsai (2008) eredményei arra utalnak, hogy ez a semleges pH felé történő eltolódás a kitinázokra (pl. egyes peroxidázok aktivitásával ellentétben) nem gyakorol érdemi gátló hatást. Méréseink alapján ugyanakkor nem kizárható, hogy a 3 vonal közt a különféle pH optimummal rendelkező kitinázok arányában eltérés mutatkozik. Méréseink azt mutatták, hogy a kitináz aktivitás (az 1,3-glükanázokhoz hasonlóan) a fertőzést követő 10-12. óráig mindhárom genotípus kontroll és a fertőzött mintáiban egyaránt alacsony. Az időzítés jól illeszkedik a búza levélrozsda fejlődésmenetéhez. Ismert, hogy a spóra, megfelelően párás körülmények közt 4-6 óra alatt képes csíratömlőt fejleszteni a levél felszínén, s csak ezt követően lép intercelluláris képletein át a növényi sejtekkel közelebbi érintkezésbe (Slawecki et al. 2002).

A fogékony Tc fajtában a fertőzés kissé korábbi, s kezdetben a rezisztens vonalakét is meghaladó kitináz aktivitás-választ indukál (10-24 h.p.i), amely azonban hamar alacsony plató-értékben állandósul (1-4 d.p.i), majd az aktivitás folyamatosan mérséklődéssel, a 6. napra simul bele az egészséges egyedek azonos időszakban mért aktivitásgörbéjébe (14.B ábra). Az Lr1 és Lr9 vonalak fertőzéssel asszociált kitináz aktivitásának emelkedése a Tc fajta válaszához képest pár órával késleltetve és lassabb tempóban indul meg, de idővel (1-2. d.p.i) elhagyják a fertőzött Tc említett, mérsékelt plató szintjét. A görbék alapján úgy tűnik, hogy a rezisztens mintákban két (Lr1), esetleg három (Lr9) hullámban indukálódnak szekretált kitinázok. Az első két aktivitás-növekedési lépcső az elért plató fázisok időbeli eloszlásában (1-2. és 4-5. nap) és intenzitását (10 ill.15 mg hasított szubsztrát/h, g levéltömeg) tekintve is hasonlónak tűnik, bár az Lr1 vonalban a két aktivitási hullám kifejeződésének sebessége valamivel gyorsabbnak tűnik. Az Lr9-ben megfigyelhető harmadik hullámban az aktivitás a fogékony Tc fajta maximumának közel négyszerese, s az Lr1 vonalét is közel 20 %-kal meghaladja.

Mindezek alapján feltételezhető, hogy az Lr1 és Lr9 rezisztenciagént hordozó vonalak apoplasztjában detektált, extracelluláris kitinázok – pl. a konstitutíve kitinázt expresszáló Tc/Lr35 genotípussal szemben (Anguelova-Merhar *et al.* 2002) – az indukált védekezés közreműködőiként részt vesznek a csíranövény-rezisztencia kialakításában.

Eredményeink a három genotípusban indukálódott, extracelluláris 1,3-glükanázok és kitinázok eltérő szabályzására utalhatnak, illetve részben más izoformák, osztályok, esetleg családok szerepét is felvethetik a fogékony és a rezisztens válaszokban, s akár a Lr1 és az Lr9 vonalak szintjén is.

Az apoplasztikus aktivitás-assayek szükségességét egyrészt a két rezisztens búzavonal rozsdafertőzött ICF mintáiban (3. ill. 5. nap p.i.) proteomikailag már azonosított, számos endo-1,3-glükanáz indokolta, melyeknek megfelelő molekulatömeg-régióban a Tc fehérjemintái nem vagy kevéssé intenzív festődést mutattak. Másrészt, egy mindhárom vonalban közös kitináz 1 fehérje miatt is vizsgálódtunk, amelynek megfelelő sávot a fogékony vonalban csak későbbi időpontban sikerült kimutatnunk. A pillanatfelvétel jellegű kísérletek alapján ugyanakkor nem volt eldönthető, hogy főként az indukció kinetikájában vagy inkább a maximálisan indukált enzimek eltérő

mennyiségében rejlik a fogékony és a rezisztens fajták válaszának eltérése az endo-1,3-β-Dglükanázok ill. kitinázok tekintetében.

Aktivitásméréseink alapján az utóbbi magyarázat tűnik helyesnek. Az Lr1 ill. Lr9 rezisztenciagént hordozó 'Thatcher' alapú búzavonalak intercelluláris folyadékában tehát a **fertőzést követően nagyobb mennyiségben** jelennek meg **és tartósan magas aktivitás-szinten** maradnak az általunk vizsgált **apoplasztikus 1,3-β-D-glükanázok** és **kitinázok**, ami a sikeres védekezésben betöltött szerepükre utal.

Fontos megjegyezni, hogy míg az Lr1-ben és az Lr9-ben ezen enzimek indukálódnak a fertőzés hatására, addig a szintén 'Thatcher' hátterű, de Lr35 rezisztenciagént hordozó vonal nem indukálhatóan, hanem konstitutívan magasabb 1,3- $\beta$ -D-glükanáz és kitináz aktivitással jellemezhető (Anguelova *et al.* 1999, Anguelova-Merhar *et al.* 2002). Az Lr29 és az Lr34 gént hordozó, 'Palmiet' alapú vonalakban viszont úgy tűnik, hogy a vizsgált enzimek indukciója megegyezik a fogékony fajtáéval, így ezek feltehetőleg nem játszanak érdemi szerepet a levélrozsda elleni rezisztencia kifejlődésében (Kemp *et al.* 1999).

### 5.1.3 Transzkripciós analízis indukálódó glükanáz és kitináz izoformákon

Annak érdekében, hogy a levélrozsda-fertőzés kapcsán búza apoplasztjában proteomikailag azonosított glükanázok és kitinázok kifejeződésének változását transzkripciós szinten is megerősíthessük ill. nyomon követhessük a fogékony és a rezisztens búzavonalak stresszválaszaiban, és hogy magyarázatot találjunk az aktivitásukban megfigyelt eltérésekre, génexpressziós vizsgálatokat kezdtünk meg az említett két géncsoporton. A munkában jelentős részt vállalt hallgatóm, Szikriszt Bernadett (2009) diplomamunkájában.

Első közelítésben az volt a célunk, hogy egy-egy olyan glükanáz / kitináz expressziójának esetleges eltéréseit igazoljuk, melynek esetében a proteomikai elemzés korábbi vagy intenzívebb indukcióra utalt a vizsgált genotípusok valamelyikében. Ennek érdekében elsősorban a proteomikailag már azonosított triptikus peptidekből levezetett nukleinsav-régiókra terveztünk primerpárokat. A sikerrel felsokszorozott és klónozott szekvenciák relevanciáját, a primertervezés és a PCR ismert módszertani nehézségein kívül egyéb tényezők is veszélyeztették. Egyrészt, a proteomikai azonosítás biztonsága csak a triptikus szekvenciákkal lefedhető szakaszokban kielégítő, amit a kódszótár degeneráltsága tovább csökkent, másrészt az allohexaploid és több ezer fajtával bíró búza rendszerében a keresés alapjául szolgáló nukleotid- és fehérje-adatbázisok maguk is hiányosak, így

a lehetséges izoformák sokfélesége és interferenciája óriás mértékben megnehezíti a megbízható azonosítást.

# 5.1.3.1 Putatív 1,3-glükanáz transzkriptumok amplifikálása proteomikai eredményekre alapozva

## 5.1.3.1.1 Szűk körre specifikus endo-1,3-glükanáz primerek alkalmazása

Korai proteomikai kísérleteink során olyan apoplasztikus, ~33 kDa méretű, lúgos **endo-1,3glükanáz** fehérjéket detektáltunk az Lr1 (3 dpi), majd az Lr9 rezisztenciagént hordozó búzavonalban (5 dpi), amelyek a fogékony Tc fajtával szemben feltételezhetően korábban, illetve nagyobb intenzitással indukálódtak a levélrozsdafertőzést követően. Az említett, búza endo-1,3-béta glükanáz fehérjéket Lr1-ben előbb glucan endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidase-ként (CAA77085; Pós *et al.* 2005), majd az adatbázisok fejlődésével egy másik  $\beta$ -1,3-glucanase-ként (AAY88778 ill. AAY96422) azonosítottuk, az Lr9-ben azonban végül mindkét, közel rokon szekretált fehérje jelenlétét sikerült bizonyítani.

A két glükanáz szekvenciára egy primerpárt terveztünk - TaeGlu3 - (6. tábl.), és azt első lépésben a fertőzést követő 3. napon begyűjtött levélmintákon teszteltük specifikus primeres RT-PCR révén (57 °C, 40 ciklus). A gélképen (15. ábra) látható, hogy a fogékony Tc kontroll és fertőzött mintáiban nem kaptunk terméket, a rezisztens Lr9 búzavonal fertőzött mintájában viszont egy intenzív sáv jelenléte volt megfigyelhető a várt terméknek megfelelő (~226 bp) mérettartományban.



**15. ábra:** A TaeGlu3 primerpárral (3 d.p.i.) végzett, specifikus primeres RT-PCR (57 °C, 40 ciklus) eredménye. (TcK: Tc kontroll; TcF: Tc fertőzött; Lr9K: Lr9 kontroll; Lr9F: Lr9 fertőzött minták 3 nappal a fertőzést követően; M: 100 bp DNS marker; (+): PCR-pozitív kontroll; (-): templátmentes kontroll, (RT-): templátmentes RT-ált elegyet PCR-ező kontroll). A TaeGlu3-es primerpár a Lr9 vonal fertőzött mintájában adott terméket, mely megfelel a várt 226 bp-os méretnek.

A rezisztens Lr9 vonalban amplifikált TaeGlu3 PCR-termék azonosítása (gélből való visszaizolálás, klónozás majd szekvenálás két független klónból) igazolta várakozásainkat: az egymástól csupán 5 nukleotid pozícióban eltérő szekvenciáink legközelebbi rokonaiként az MS-alapon várt 3 búzafehérje transzkriptumait nevezhetjük meg (Y18212; DQ090946/DQ078255), a szűkebb ágba tartozó egyéb, pl. árpa homológokkal (16.A ábra). A szekvenciák transzlált formában egyazon szekvenciát kódolnak, amely egy illetve két aminosavban (Ser<sup>26</sup>  $\leftrightarrow$  Ala<sup>26</sup>; Thr<sup>29</sup> $\leftrightarrow$ Met<sup>29</sup>) tér el a fertőzött Lr9-ben MS-alapon feltételezett CAA77085 ill. AAY96422/AAY88778) búzafehérjéinktől (16.B ábra).



16. ábra: Az Lr9 vonal fertőzött (3 dpi) mintáiból TaeGlu3 primerpárral amplifikált PCR termékek klónjainak szekvenciális hasonlósága gabonaféle endo-1,3-glükanázokkal. A.) nukleinsavalapú B.) fehérje-szintű homológia (ClustalW). (A klónok szürke háttérrel, a pozícionális eltérések a fejlécen vörös fülek formájában kiemelve. *Ta:* T. aestivum (búza), *Hv:* H. vulgare (árpa), *Sc:* S. cereale (rozs), *As:* A. sativa (zab) eredetű szekvencia). Az illesztések jól érzékeltetik, hogy a TaeGlu3 primerpár valóban a keresett, szükebb glükanáz csoport képviselőit amplifikálja: az '1a' klón mindössze 2-2 nukleotidban, a '2a' pedig 3 ill. 4 nukleotidban tér el az MS-alapon feltételezett és keresett Y18212 ill. DQ090946/DQ078255 transzkriptumoktól. A klónok nyers transzlátumai fehérjetermékek szintjén már nem térnek el egymástól, és az előbbi transzkriptumoknak megfeleltethető, várt glükanáz fehérjékhez képest pedig mindössze 1 illetve 2 aminosavnyi (26.: Ser vs. Ala, továbbá 29.: Thr vs. Met) változást mutatnak.

### 5.1.3.1.2 A glüko-hidroláz 17. család- ill. alcsalád-specifikus primerek tervezése

Mivel időközben fehérje szinten – a korábban említettekhez képest – összességében további 5 glükanáz is azonosításra került az általunk vizsgált Lr9 genotípus rozsdafertőzésével asszociáltan (12.B ábra, 7. táblázat), próbáltunk olyan "általánosabb" primereket is tervezni, amelyek az adatbázisban már szereplő vagy ismeretlen, de minél több, esetlegesen indukálódó glükanáz szekvenciához kitapadhatnak. А primerek tervezése, а glükanázok filogenetikai kapcsolatrendszerének figyelembe vétele mellett történt, melyhez jelentős támpontot adott az a 2006-ban Higa-Nishiyama és mtsai által publikált, kifejezetten a gabonafélékben előforduló  $\beta$ -Dglükanázokra felállított törzsfa (ld. 7. ábra), melyben a szerzők a szekvencia és funkció alapján 4 alcsaládot különítettek el (A-D). Érdeklődésünk leginkább az első két alcsaládra irányult, mivel az Lr1-ben és Lr9-ben tömegspektrometriai úton azonosított két (AAY88778/AAY96422, CAA77085), illetve a Lr9-ből izolált további 3 búza glükanáz fehérje (CAI64809, AAD28732 és BAE96089) mind a szekvenciálisan meglehetősen heterogén A-alcsaládba (endo-1,3-βglükanázok), a Tc-ben kimutatott búza glükanáz (ABB96917) viszont, a B-alcsaládba (endo-1,3-1,4-glükanázok) volt sorolható. A gomba-hausztóriumok sejtfalát is bontani képes A-alcsalád vizsgálatát azért is fontosnak tartottuk, mert a három vizsgált vonal apoplasztikus endo-1,3- $\beta$ glükanáz aktivitásában genotípus-függő indukciós eltérésekre utaló jeleket láttunk (Rab 2008).

A tervezett 5 forward és 2 reverse glükanáz primer kombinációi közül egy univerzális (TaeGluF4-R5), kettő A- (TaeGluF5-R4; TaeGluF6-R4) és kettő B-alosztály specifikus (TaeGluF6-R4, TaeGluF8-R4) amplifikálást tett elvileg lehetővé (6. táblázat). A primerek összes kombinációját teszteltük a Tc és a Lr9 vonal fertőzött levélmintáin (7 dpi), melynek érdekében a reverz transzkripciót oligo(dT)<sub>18</sub>-s és specifikus primeres átírással is elvégeztük, majd az így megszintetizált cDNS-eket PCR-eztük.

Mivel az oligo(dT)<sub>18</sub>-vel átírt cDNS-ek PCR-ezése során (55 °C, 35 ciklus) egy esetben sem kaptunk látható terméket, csökkentettük a primerkitapadási hőmérsékletet és specifikus primeres átírást követő PCR-t végeztünk (53 °C, 35 ciklus). Ez a változtatás, a vélhetően kevéssé sztringens annelláció miatt kapott számos kisebb, ill. aspecifikus termék megjelenése mellett egy, a glükanázok A alcsaládjára specifikus TaeGluF5-R4 primerkombinációnál relevánsnak tűnő eredményre vezetett, a rezisztens Lr9F mintában a várt méretnél, ~278 bp-nál jelentkező PCR-termék képében (17. ábra).



17. ábra: Alcsaládra specifikusan tervezett glükanáz primerek tesztelése 10 lehetséges forward-reverse kombinációban, specifikus primeres RT-PCR (53 °C, 35 ciklus) során. Minták: Tc és Lr9 vonal 7 d.p.i., M: 100 bp-os DNS marker, (+): PCR-pozitív kontroll, X-Y: primerkombináció – a számpár első tagja a forward, a második a reverse primer sorszámát jelöli. A tesztelt kombinációk – a vélhetően az alacsony annelációs hőmérséklet miatt kapott számos aspecifikus termék mellett – két, a glükanázok A alcsaládjára specifikus primerpárnál adtak értékelhető méretű terméket a fogékony és rezisztens vonalak fertőzött mintájában (TaeGluF6-R5: Tc-re és TaeGluF5-R4: Lr9-re pozitív eredmény), melyek közül méretben és szekvenciában az Lr9 PCR terméke bizonyult relevánsnak.

A várakozásnak megfelelő (Lr9F/TaeGluF5-R4: ~278 bp termék) és egy a vártnál kisebb, de elvben szintén A-alcsaládra specifikus termék (TcF/TaeGluF6-R5: ~400 bp termék a várt ~770 bp helyett) klónozását és szekvenálását elvégezve, csak a rezisztens Lr9 vonalból amplifikált, közel megegyező szekvenciák glükanáz-jellege igazolódott. A TaeGluF5-R4 primerpárral amplifikált cDNS-klónok szekvenciális rokonságát a gabonaféle glükanázok más képviselőivel a 18. és 19. ábrán, szekvenciaillesztés ill. törzsfa formájában szemléltetjük.

A 18. ábrán látható, hogy az NCBI BLAST alapján két szekvenált klónunk közül (Lr9-inf(7dpi)\_(GluF5-R4)/1a és /2a) előbbi a *TaGlb2f*, míg utóbbi a *TaGlb2b* búzagén transzkriptumára (AB244642.1 – >98 % ill. AB244638.2 – 100 %) illeszkedik leginkább. Említett két klónunk ugyanakkor szorosan rokonítható a *TaGlb2a* gén transzkriptumával is (AB2445637), melynek megfelelő fehérjeterméket (BAE96089) korábban, egy ~38 kDa-s endo-1,3-glükanáz fehérje képében MS-alapon szintén igazoltuk az Lr9 búza vonal fertőzött (5 d.p.i.) mintájából (vö. 5.1.1 fejezet - 12.B ábra/'1' sáv ill. 13. ábra és 7. táblázat).

A géncsoport búzában eddigiekben ismert *TaGlb2a-f* tagjai közül (vö. 19. ábra) épp a levélspecifikus *TaGlb2a* és a levélben és kalászvirágzatban is kifejeződni képes *TaGlb2b* esetében bizonyítottak *Erisiphe-* ill. *Fusarium*-fertőzés kapcsán PR2 jelleget, míg a közel rokon, jórészt pelyvában és toklászban kimutatható *TaGlb2c* és *TaGlb2d* a *Fusarium*-fertőzésre éppen csökkenő expressziót mutatott (Higa-Nishiyama *et al.* 2006). Emiatt úgy véljük, hogy a fertőzött Lr9 (7 d.p.i.) mintában TaeGluF5-R4 primerpárral azonosított transzkriptumokból valóban PR2-jellegű fehérjék transzlálódnak.

#### A.



18. ábra: Az egyszikű glükanázok A-alcsaládjára tervezett, TaeGluF5-R4 primerpárral kapott PCR termékek (fertőzött Lr9, 7 d.p.i.) két klónjának szekvenciális rokonsága a gabonaféle glükanázok közel rokon képviselőivel - A.) nukleinsav-alapú B.) aminosav-szintű homológia (ClustalW). (A fejlécen vörös fülek formájában azok a pozíciókat emeltük ki, amelyek alapján az alcsalád ismert képviselői közt klónjainkat egyértelműen besorolhatjuk. *Ta: T. aestivum* (búza), *Hv: H. vulgare* (árpa), *Os: O. sativa* (rizs), *Sb: S. bicolor* (köles) eredetű szekvencia.) A két szekvenált klón révén (szürke háttérben), a teljes A-alcsaládon belül egyelőre csak a búzában *TaGlb2a-f* gének által képviselt, jellegzetes glükanáz-ág egyes tagjainak fertőzéssel asszociált expresszióját erősíthetjük meg: a PR-2 jellegű *TaGlb2f* ('1a' klón - Δ: 1 nt) és *TaGlb2b* ('2a' klón - Δ: 0 nt) 1,3-glükanázok képében. A két gén közeli hasonlóságot mutat a *TaGlb2a*-val, amelynek indukcióját fehérjeterméke szintjén (BAE96089) levélrozsda-fertőzött Lr9 vonalban MS-alapon (5 d.p.i.) már valószínűsítettük. A TaeGluF5-R4 primerpár A-alcsaládra érvényes, általánosabb specificitásáról ugyanakkor nem vonhatunk le mélyebb következtetéseket.

Meglepő, hogy a primerpár egész A-alcsaládra tervezett volta és az Lr9-ben proteomikailag is várható heterogenitás (5 d.p.i.) ellenére a TaeGluF5-R4 primerpárral két rendkívül hasonló Lr9 klónt (7 d.p.i.) izoláltunk (18. és 19. ábra). Ennek hátterében a *TaeGlb2a-f* glükanáz-ág egyes tagjainak az adott időpontban valósan domináló expressziója mellett a primerpár a tervezettnél szűkebb specificitása és a PCR amplifikációs hatékonyságát érintő, módszertani különbségek (pl. kitapadási erősséget érintő, ill. termékméretbeli eltérések) is állhatnak. Nyilvánvaló továbbá, hogy a számos független klón közül kettő analizálása nem versenyezhet egy teljes klónkönyvtár kiterjedtebb szekvenálás-sorozatából nyerhető lefedettséggel és annak statisztikai megbízhatóságával.



19. ábra: Az Lr9 búzavonal fertőzött (3 ill. 7 d.p.i.) mintáiból a TaeGluF3-R3 ill. TaeGluF5-R4 primerpárral amplifikált cDNS-klónok helye az egyszikű glükanázok filogenetikai kapcsolatrendszerében. Az 1000 bootstrap ismétlés alapján számított konszenzus törzsfa MEGA4 programmal készült (N-J módszer, pairwise-aligment opció) - az ábrán a 60 %-nál nagyobb megbízhatósággal elváló ágakat kékkel, a 90 %-nál erősebbeket vörössel jelöltük, a bootstrap-értékeknek megfelelően. Zöld, kék ill. vörös háttérrel kiemelve a rezisztens Lr9 (5 dpi), Lr1 (3 dpi) ill. a fogékony Tc (5 dpi) vonalban korábban MS-alapon azonosított glükanáz fehérjék megfelelő transzkriptumai láthatók (a zöld-kék sávozás a mindkét rezisztens vonalban azonosított fehérjék transzkriptumait jelöli). A Glu3 ill. GluF5-R4 primerpárokkal amplifikált cDNS-klónjaink (piros betűkkel) az endo-1,3-glükanázok két, jól körülhatárolható ágának szekvenciáival mutatnak azonosságot vagy közeli illeszkedést.

## 5.1.3.2. Putatív kitináz transzkriptumok amplifikálása proteomikai

## eredményekre alapozva

### 5.1.3.2.1 Szűk körre specifikus kitináz primerek alkalmazása

A búza levélrozsda-fertőzéssel összefüggésben végzett korábbi proteomikai kutatások során tömegspektrometriai úton egy olyan búza **kitináz I** fehérjét (BAB82471) azonosítottunk mindhárom vizsgált búzavonalban, amely a fertőzést követő egy hét tanúsága szerint a fogékony 'Thatcher' fajtához képest erőteljesebben indukálódott a rezisztenciát mutató Lr1 és Lr9 vonalban. Erre az eredményre alapozva terveztünk nukleinsav szintű kísérleteket, és két primerpárt, TaeChi2 és TaeChi3 néven (6. táblázat).

A fertőzést követő 3. napos, fogékony Tc illetve rezisztens Lr9 levélmintákból tisztított totál RNSkivonatokból specifikus primeres reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk, majd a kapott RTtermékeket – növekvő (0,1; 0,3 ill. 1  $\mu$ l) templátmennyiségekből kiindulva – hagyományos PCRnek vetettük alá (anneláció: 56 ill. 58°C, 40 ciklus). A 20. ábrán látható termékeket kaptuk.



20. ábra: A TaeChi2-, illetve TaeChi3-primerpárral, RT-PCR során amplifikált termékek. A templátok – növekvő mennyiséggel – a levélrozsdafertőzést követő 3. napos totál RNS kivonatok specifikus primeres reverz transzkripcióból származtak, a fogékony Thatcher (Tc) fajta és a rezisztens Lr9 vonal kontroll (K) ill. fertőzött (F) levélmintáiból; M: 100 bp-os DNS marker; (+): PCR-pozitív kontroll; (-): templátmentes kontroll. A.) Az ábrán látható, hogy a TaeChi2-es primerpárral PCR-terméket csak a rezisztens, Lr9 vonalban kaptunk: a fertőzött mintában (Lr9F) jelentkező, várt méretű ~500 bp-os termék mellett, a kontroll (Lr9K) mintákban egy ~240 bp-os PCR termék is amplifikálódott. B.) A TaeChi3-as primerpár a Tc és Lr9 vonal kontroll és fertőzött mintáiban is várt méretű, ~192 bp terméket adott, az alábbi intenzitási sorrend szerint: Lr9F >> TcF> TcK ≥ Lr9K). Az azonosítás izolálás és klónozást követő szekvenálással zajlott.

A TaeChi2-es primerrel csak a rezisztens Lr9 vonalban kaptunk pozitív eredményt: a várt, ~500 bpos terméket az Lr9 fertőzött mintájából izoláltuk, míg a kontroll mintában egy ~240 bp-os PCR termék amplifikálódott. Az Lr9F-ből nyert klónok közül kettőt (a továbbiakban: Lr9inf(3dpi)\_Chi2/13 ill. /14 klón) szekvenáltattunk, mindkét esetben azonos eredménnyel. A Chi2 klónok szekvencia-analíziséből és az NCBI adatbázis–lekeresésekből (21. ábra) azt valószínűsítjük, hogy a fragmentum egy, a kitinázok II osztályba sorolható búza kitináz transzkriptumából származik. A 426 bp PCR termék egy árpa chitinase 2a géntermékével (X78671) mutatta a legnagyobb fokú egyezést, 85 %-os szekvencia-azonossággal és 2 %-nyi 'gap'-értékkel. Bár jellegében hasonló búzaszekvencia az NCBI adatbázisban eddig még nem szerepel, a **TA97587\_4565** jelű kontig képében Chi2 klónjainkkal érdemben (1 nt eltérés) megegyező szekvenciát találtunk a TIGR klóntár *Triticum aestivum* transcript assembly gyűjteményében.

A 22. ábrán bemutatott szekvenciaillesztésekből jól látszik, hogy az Lr9 eredetű Chi2 klónok levezetett aminosav-szekvenciája is érdemi, következetes eltéréseket mutat az eddig búzában ill. közel rokon gabonafélékben publikált, rokonítható fehérjékkel. Ezek közt említendő egy 5 aminosavat érintő deléció (RGAAD), az azt közvetlenül megelőző konszenzus szekvencia végén fellépő Thr  $\rightarrow$  Pro cserével. A prolin  $\alpha$ -hélix szerkezetet megtörő tulajdonsága közismert, így az aminosav-cserének akár szerkezeti kihatása is lehet.

A TaeChi2 primerpárral a rezisztens vonal kontroll mintájában amplifikált, ~240 bp-nyi, nem várt méretű PCR termék klónjainak (Lr9-co(3dpi)\_Chi3/8 és \_Chi3/11) szekvenálási eredményeként elmondható, hogy a ligálás során a plazmidba vélhetően egy kísérletünk szempontjából nem releváns, de a primerrel mutatott szekvenciaazonossága miatt szintén amplifikálódott, 23S riboszomális RNS-fragment épülhetett be. Erre, mivel a cDNS templát előállításához nem mRNS-ből, hanem totál RNS-ből indultunk ki, a rendszer lehetőséget adott. Arra a kérdésre, hogy ez utóbbi termék miért csak a rezisztens vonalban van jelen, s a fogékony kontroll mintákban miért nem, magyarázatként az alábbi megjegyzés tehetjük: a Thatcher-alapú, azzal közel izogén (genetikailag ~98 %-ban azonos) Lr9 vonal természetes nemesítés révén, az Aegilops umbellulata géndonorként való felhasználásával, majd a hibrid sokszoros visszakeresztezésével született meg (Sears, 1956). Elképzelhető, hogy a homológ rekombináció során a 6B kromoszómába (Schachermayr et al. 1994) épült Lr9 gén mellett más gének is átjuthattak és megmaradhattak az új vonalban. Annál is inkább, mert az NCBI adatbázisban található adatok szerint az eredetileg kloroplasztisz eredetű 23S rRNS-fragmenttel teljesen azonos szekvencia jelenléte más pázsitfűfélék mitokondriális, sőt nukleáris genomjában – pl. Oryza esetében több kromoszómán is – ismert.

A TaeChi3-as primerpárral felszaporított, tisztított és ligált termékek transzformálása az Lr9 kontrollja kivételével sikeres volt. A Tc kontrollból két (1-2B), a fertőzött Tc és Lr9 mintákból pedig négy-négy (1-4A) független klónt küldtünk szekvenálásra.



21. ábra: Chi1 génre (AB029934) specifikusan tervezett TaeChi2 ill. TaeChi3 primerpárral amplifikált cDNS-klónok szekvenciaillesztése az NCBI adatbázis legnagyobb hasonlóságot mutató kitináz-homológjaival (Vector NTI Advance<sup>™</sup> 11.0 program, részlet). Kiindulási templátként az Lr9 ill. Tc vonalak 3 d.p.i. mintáiból nyert mRNS-t ill. cDNS-t használtuk. (Jelölések: co: kontroll, inf: fertőzött; Ta: *T. aestivum* (búza); Hv: *H. vulgare* (árpa); Sc: *S. cereale* (rozs); piros karika: a keresett búza Chi1 géntermék (AB029934).) Jól kivehető, hogy az Lr9 3 d.p.i. fertőzött mintáiból a TaeChi2 primerpárral amplifikált és klónozott cDNS fragmentek (bordó keretben) érdemi, míg a TaeChi3 primerekkel kapott, Lr9 ill Tc vonal kontroll és fertőzött mintáiból is amplifikálható cDNS fragmentek klónjai (zöld keretben) kismértékű eltérést mutatnak az NCBI adatbázisban jelenleg elérhető, legközebbi rokon szekvenciákkal. A Chi2 klónt 1 nukleotid eltérés kivételével magában foglaló TA97587\_4565, továbbá a Chi3 klónokkal azonos vagy 1 pozíciónyi eltérést mutató szekvenciarészlettel bíró TA53878\_4565 és TA53666\_4565 jelű kontigokat (TIGR) a szekvenciaillesztésben nem szerepeltetjük.

A Chi3 szekvencia-analízisek alapján feltételezhető, hogy az expresszált gének leginkább két típusba sorolhatóak. Az egyik ágat képviselő cDNS fragmenst a Tc kontroll és fertőzött mintáiból egyaránt izoláltuk (21. ábra, Tc-co(3dpi)\_Chi3/1B, 2A, 2B és Tc-inf(3dpi)\_Chi3/1A, 2A), és megállapítottuk, hogy a **TA53878\_4565** jelű TIGR kontig megfelelő régiójával mutat 100 %-os azonosságot. A másik ágba olyan cDNS klónok tartoznak, amelyeket egyelőre csak fertőzött (Tc vagy Lr9) mintákból sikerült amplifikálni, és szekvenciájuk az előbbihez nagyon hasonlító **TA53666\_4565** jelű TIGR kontigban köszön vissza, 100 %-os (21. ábra; Tc-inf(3dpi)\_Chi3/3A, 4A és Lr9-inf(3dpi)\_Chi3/2A, 4A) ill. 98 % egyezéssel (pl. Lr9-inf(3dpi)\_Chi3/3A). Az Lr9 kontroll Chi3 klónok jövőbeni analízise a tipizálás értelméről is tisztább képet adhat, az azonban egyértelmű, hogy szekvenált Chi3 klónjaink mindegyike igen szorosan (8-10 pozíciót érintő, elszórt eltérésekkel) rokonítható a búza chi1 (AB029934) transzkriptummal. A 25 ábra szekvencia-összevetéseiben a Chi2 ill. Chi3 klónokkal homológ kontigokat nem, csak teljes transzkriptumokat (NCBI) használtunk fel.

A Chi3 klónokból visszavezethető génformák egymás közti minimális eltérései *szinonim* jellegűek, fehérje-szinten, nyers transzlátum képében már nem különíthetőek el (22. ábra). Esetlegesen változó expressziós intenzitásukkal így a Chi3 klónoknak megfelelő génváltozatok bármelyike hozzájárulhat a genotípusok szerinti ill. kontroll-fertőzött viszonylatban protein szinten mutatkozó eltérésekhez. Levezetett aminosav-szekvenciájuk a keresett búza kitináz 1 szekvenciát is magába foglaló, de leginkább II. osztályú kitinázokat felölelő ággal hozható igen szoros rokonságba (23. ábra), azonban az adott szekvencia-szakaszon 1-1 aminosav-csere miatt azok egyikével sem egyezik teljesen (ld. 22. ábra 197.: Q $\leftrightarrow$ R és 231.: M $\leftrightarrow$ I).

A specifikus TaeChi2 ill. TaeChi3 primerekkel kapott klónjaink, az azonosított szekvencia-régiók elhelyezkedése, hossza illetve variabilitása alapján, valamint az egyelőre hiányos és nem következetes nevezéktanú szekvencia-adatbázisok miatt sajnos nem nyújtanak elégséges támpontot arra nézve, hogy a kétféle primerpárral amplifikált cDNS fragmentek a kitinázok I vagy II osztályába sorolható gének expressziójára vezethetőek-e vissza.

Ezidáig azonosított klónjaink azonban kiváló példái annak, hogy bizonyítható legyen: a reverse vagy forward genetikai közelítés sok esetben egyáltalán nem elégséges, s nem feltétlenül vezet egyértelmű eredményekhez. Így, egyes proteomikailag azonosított fehérjéknek valóban megfelelő transzkriptumok mellett számos eddig ismeretlen, de közel rokon génforma expressziója is hozzájárulhat az adott (stressz)élettani állapotnak megfelelő válasz kialakításához, sőt, az aktuális traszkriptom ismeretében sem vezethető le egyértelműen egy-egy adott élettani állapotra jellemző

teljes fehérje-sokféleség. Különösen igaz ez olyan esetekben, ahol a vizsgált faj vagy fajta genomja még nem teljes mértékben ismert, és, mint pl. a búza esetében, akár számos ősi faj genomjának többszöri, komplex vegyítéséből született. Az Lr9-ben proteomikailag azonosított 3 kitináz fehérjének megfelelő géntermékek azonosítását mindenesetre – specifikusabb primerek alkalmazásával – folytatni tervezzük.

Section 3									
	(135)	135	140	150	160	170	180	190	201
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (7 folt - 6%)	(16)								
[Triticum] chitinase II prec AAD28730	(86)	<mark>AFFA</mark> H	IF <mark>T</mark> HET	GYMCYIEEKI	)GASQN <mark>YC</mark> DTI	NYPLWPC <mark>T</mark> SG	KA	YY <mark>GRGPL</mark> QL	TWN-YN
[Triticum] chitinase IV prec AAD28733	(127)	<mark>AFF</mark> A	IFI <mark>HET</mark>	GHMCSIEEN	GGASKD <mark>YC</mark> DE:	INTQWPC <mark>TP</mark> G	KA	YY <mark>GRGPL</mark> QL	SWN-Y <mark>N</mark>
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (2 folt - 12%)	(9)							<mark>GP</mark> IQI	SY <mark>N</mark> Y- <mark>N</mark>
[Secale] 31.7 kD cl. I endochi-antifreeze pr. prec	. (134)	AFL <mark>AÇ</mark>	QTS <mark>HET</mark>	TGGWPTAPD0	GP <mark>Y</mark> S <mark>WGYCF</mark> N(	Q <mark>e</mark> rgap <mark>s</mark> dycsp	SSQWPCAPGKK	Y <mark>F</mark> GRGP <mark>IQ</mark> I	SY <mark>N</mark> -Y <mark>N</mark>
[Triticum] cl. I chitinase - AAR11388	(135)	AFL <mark>AÇ</mark>	OTS <mark>HET</mark>	TGGWPTAPD	GP <mark>Y</mark> S <mark>WGYCF</mark> N(	<mark>DE</mark> RGAT <mark>S</mark> DYCTP	SSQWPCAPGKK	Y <mark>F</mark> GRGP <mark>IQ</mark> I	SH <mark>N</mark> -Y <mark>N</mark>
Tript. peptidek - Lr1 (3 dpi) (2A folt - 29%	) (1)					<mark>ATSPP</mark>		YYGR	
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (7 folt - 42%)	(22)	<mark>AF</mark> FGÇ	)TS <mark>HET</mark>	TGGTR		<mark>ATSPP</mark>		YY <mark>GRGP</mark> IQL	TGR- <mark>S</mark> N
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (8 folt - 37%)	(22)	AF <mark>FG</mark>	QTS <mark>HET</mark>	TGGTR		<mark>ATSPP</mark>		YY <mark>GRGPIQ</mark> L	TGR- <mark>SN</mark>
Tript. peptidek - Tc (5 dpi) (2x folt - 32%)	(4)	AFFGÇ	DTS <mark>HET</mark>	TGGTR				<mark>GPIQ</mark> L	TGR
Tript. peptidek - Tc (5 dpi) (3x folt - 14%)	(4)	AF <mark>FGÇ</mark>	TS <mark>HET</mark>	TGGTR					
[Triticum] chitinase 1 - BAB82471	(85)	AF <mark>FGÇ</mark>	)TS <mark>HET</mark>	TGGTRGAAD	-QFQWG <mark>YC</mark> FKI	EEI <mark>SKATSPP</mark>		YY <mark>GRGP</mark> IQL	TGR- <mark>SN</mark>
[Hordeum] chitinase (2a) - CAA55344	(85)	AF <mark>FGÇ</mark>	)TS <mark>HET</mark>	TGGTRGAAD	-QFQWG <mark>YC</mark> FKI	EEI <mark>SKATSPP</mark>		YY <mark>GRGPIQL</mark>	TGR-SN
[Hordeum] chitinase II (PR3) - CAB99486	(78)	AF <mark>FG</mark>	<u>TSHET</u>	TGGTRGAAD	- <mark>QFQWG<mark>YC</mark>FKI</mark>	EEI <mark>N</mark> KATSPP		YYGRGP IQL	TG <mark>Q-</mark> SN
Transzl. cDNS - Tc, Lr9-co, inf (3dpi)_Chi3 klór	nok (1)					<mark>PP</mark>		YY <mark>GRGP</mark> IQL	TG <mark>Q</mark> -S <mark>N</mark>
[Hordeum] chitinase (2b) - CAA55345	(81)	<mark>AF</mark> FGÇ	OTS <mark>HET</mark>	TGGTRGAAD	-QFQWG <mark>YC</mark> FKI	EEI <mark>NKATSPP</mark>		YY <mark>GRGPIQL</mark>	TG <mark>Q</mark> -S <mark>N</mark>
[Secale] 24.8 kD cl. II endochi-antifreeze pr. pred	c. (81)	<mark>AF</mark> FGÇ	TS <mark>HET</mark>	TGGTRGAAD	-QFQWG <mark>YC</mark> FKI	EEI <mark>NKATSPP</mark>		YY <mark>GRGP</mark> IQL	TGR-SN
Transzl. cDNS - Lr9-inf(3dpi)_Chi2 klónok	(1)		HET	TGGP()	-QFQWG <mark>YC</mark> FKI	DQI <mark>DKTMLAP</mark>		YY <mark>GRGP</mark> IQL	TG <mark>Q</mark> -S <mark>N</mark>
Section 4	(202)	000	010	0	0	00 040	050		000
Trint, pentidek - 1 r9 (5 dpi) (7 folt - 6%)	(16)	202	210	0 22	20 23	240	200		200
[Triticum] chitinase II prec - AAD28730	(141)	VCAN	OKICE			RWEWMTN	<mark>W</mark> HOW	/D	000
[Triticum] chitinase IV prec - AAD28733	(182)	VCAAC	ESTOF			AFWEWMTN		/D	
Tript, peptidek - Lr9 (5 dpi) (2 folt - 12%)	(102)	YGPA	R				W	SPSGADOAA	GR
[Secale] 31.7 kD cl. Lendochi-antifreeze pr. prec	(200)	YGPAC	RATGT	DLUNNPDLV	TDATUSEKT		PSSHDVITCRW	SPSGADOAA	GRUPCY
[Triticum] cl. I chitinase - AAR11388	(201)	YGPAC	OATGT	DLUNNPDLV	SDATUSEKT	ALWEWMTPOSPK	PSSHDVTTGRW	SPSGADOAA	GRVPGY
Tript. peptidek - Lr1 (3 dpi) (2A folt - 29%)	) (10)						W	TPTAADTAA	GR
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (7 folt - 42%)	(56)	YDLA	RAIGK	DLVSNPDLV	STDAVVSER		RW	PTAADTAA	GR
Tript. peptidek - Lr9 (5 dpi) (8 folt - 37%)	(56)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	STDAVVSER-		RW	PTAADTAA	GR
Tript, peptidek - Tc (5 dpi) (2x folt - 32%)	(27)			DLVSNPDLV	STDAVVSER-		W	<b>PTAADTAA</b>	GR
Tript, peptidek - Tc (5 dpi) (3x folt - 14%)	(19)			DLVSNPDLV	STDAVVSER-				
[Triticum] chitinase 1 - BAB82471	(137)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	STDAVVSERT/	AMWEWMTAOGNK	PSCHNVALRRW	IPTAADTAA	GRVPGY
[Hordeum] chitinase (2a) - CAA55344	(137)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLVS	STDAVVSFRT/	AMWEWMTAOGNK	PSSHNVALRRW	PTAADTAA	GRVPGY
[Hordeum] chitinase II (PR3) - CAB99486	(130)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	ST <mark>D</mark> AVVS <mark>F</mark> RTA	AIWFWMTAOGNK	PSSHDVALGRW	PTAADTAA	GRVP <mark>G</mark> Y
Transzl. cDNS - Tc, Lr9-co, inf(3dpi) Chi3 klón	nok(17)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	ST <mark>D</mark> AVVS <mark>F</mark> RTA	AMWFW			
[Hordeum] chitinase (2b) - CAA55345	(133)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	ST <mark>DAVVS</mark> FRT	VIWFWMTAOGNK	PSSHDVALGRW	I <mark>PTAADT</mark> AA	GRVP <mark>G</mark> Y
[Secale] 24.8 kD cl. II endochi-antifreeze pr. pred	c.(133)	YDLAC	RAIGK	DLVSNPDLV	ST <mark>D</mark> AVVS <mark>F</mark> RTA	AMWFWMTAQGNK	PSSHDVALRRW	IPTAADNAA	GRVP <mark>G</mark> Y
Transzl. cDNS - Lr9-inf(3dpi)_Chi2 klónok	(41)	YDLAC	<mark>KAL</mark> KL	DLVNNPNLV	st <mark>daevs</mark> frt <i>i</i>	A <mark>MWFWMT</mark> AQDNK	PSCHDVALRRW	r <mark>p</mark> taadtaa	GRVP <mark>G</mark> Y

22. ábra: Levélrozsda fertőzött Tc, Lr1 és Lr9 vonalakban azonosított triptikus kitináz-peptidek és cDNS klónokból levezetett aminosav-szekvenciák összevetése (részlet). A proteomikailag azonosított búza kitináz 1 (BAB82471) protein triptikus peptidjeinek régiójára tervezett két primerpárral legalább két, egymástól s a keresett fehérjétől részben eltérő fehérjét kódoló cDNS-eket amplifikáltunk a fertőzést követő 3. napon. A Chi3 primerpárral Tc és Lr9 vonalban azonosított gének fehérjeterméke a vizsgált szekvencia-régióban 1-1 aminosavban különbözik a keresett búza kitináz 1 (BAB82471) protein ill. három, árpában izolált, közel rokon, kitináz 2 osztályú fehérje (CAA55344, CAB99486, CAA553435) szekvenciarészletétől (Gln (Q) vs. Arg (R) a 197., ill. Met (M) vs. Ile (I) a 231. pozícióban). A Chi2 primerpárral, csak Lr9 levélrozsda-fertőzött mintában azonosított kitináz génterméke az NCBI fehérje- és nukleinsav-adatbázisban még nem ismert, és számos pozícióban jellegzetes eltéréseket mutat a jelenleg hozzáférhető, rokon kitináz fehérjéktől. E klón szekvenciájára illeszthető viszont 1 nukleotid különbséggel a TIGR TA97587\_4565 jelű kontigja.



23. ábra: A rezisztens Lr9 és fogékony Tc vonalakban kifejeződő búza kitinázok (3 d.p.i.) Chi2 ill. Chi3 primerpárral amplifikált cDNS klónjainak hasonlósága más Poaceae fajokból ismert transzkriptumokhoz (maximális parszimónia elv, MEGA4 program). Az ábrán kivehető, hogy a várt terméket, azaz a proteomikailag azonosított búza kitináz 1 (BAB82471) fehérjének megfelelő Chi1 gén (AB029934) transzkriptumát még nem kaptuk meg a Tc ill. Lr9 mintákból amplifikált és beklónozott cDNS fragmentekből, s a két primerpár – részleges specificitása okán – vélhetően rokon, s részben eddig ismeretlen szekvenciákat amplifikált. Mivel azonban a feltételezett PCR termékek általunk beklónozott és megszekvenált hányadának egyike sem illeszkedik tökéletesen az NCBI adatbázisban jelenleg közzétett szekvenciákhoz, erdményeink további, adatbázisban még nem szereplő búza kitináz génekre utalnak, amelyek némelyike (ld. az ábrán) genotípus- vagy fertőzés-függő módon expresszálódhat. Megjegyzendő még, hogy a lefedett szakaszok alapján a kitináz I és II osztályba sorolt, rokon gének nem különíthetőek el egyértelműen.

### 5.1.3.2.2. Általános kitináz primer (glüko-hidroláz 19. család) alkalmazása

Későbbi proteomikai kutatások eredményeként, tömegspektrometriai alapon további, a levélrozsdafertőzés hatására indukálódó kitináz fehérjéket is azonosítottunk az Lr9 búzavonalban, így (12 %-os szekvencia lefedettséggel) egy rozs 31.7 kDa class I endochitinase-antifreeze (AAG53609) protein prekurzorral homológ, valamint (6 %-os lefedettséggel) egy búza chitinase IV precursor (AAD28733) fehérjével homológ proteint.

Az alábbi ábrán azt kívánjuk szemléltetni, hogy a proteomikai és transzkripciós eredményeink alapján látókörünkbe került, s az NCBI adatbázisból kigyűjtött, különböző gabonafélékben (búza, rozs, rizs, árpa) előforduló homológ kitinázok a szekvenciák egymáshoz viszonyított hasonlósága alapján milyen főbb klaszterekre oszthatók (24. ábra).



24. ábra: A proteomikai és transzkripciós eredményeink alapján az NCBI adatbázisból kigyűjtött, gabonafélékben előforduló homológ kitinázok nukleinsav-alapú hasonlósági viszonyai (MEGA4 program). (A proteomikailag azonosított kitinázok zöld háttérben szerepelnek, piros kerettel a korábban, Tc, Lr1 és Lr9 vonalban is MS-azonosított búza kitináz I fehérje, míg zöld kerettel a később, Lr9 vonal fertőzött mintájában MS-azonosított két további kitináz proteinek. A transzkripciós analízisek során azonosított főbb Chi2 és Chi3 klónjainkat piros betűvel reprezentáltuk). Az elágazásokat szemügyre véve látható, hogy ezek a fehérjék más-más ágakon foglalnak helyet. Ebből kiindulva merült fel bennünk az igény a távolabbi rokonságban álló, de potenciálisan egyaránt indukálódó kitinázok expressziójának párhuzamos megerősítésére.

A filogram jól illusztrálja, hogy a kitináz-sokféleség a kutatások során idővel proteomikai szinten is nyilvánvalóvá vált az Lr9 vonalban, és hogy a genotípus fertőzött mintáiban MS-azonosított három enzim eltérő ágakon foglal helyet. Ez okból egy további, az adatbázisokban elérhető minél több *Poaceae* kitináz szekvencia amplifikálásában is hatékony kitináz primert terveztünk (6. táblázat). A tervezett "univerzális" kitináz primerpár, TaeChiF4-R4 kitapadási helyét a 25. ábrán mutatjuk be.



25. ábra: Az "univerzális" kitináz-primerpár tervezéséhez kiválasztott 16 kitináz transzkriptum szekvenciaillesztésének részlete (ClustalW), megjelölve a tervezett univerzális, degenerált primerek (TaeChiF4 és TaeChiR4) pontos helyét és szekvenciáját. A reverz irányú primer esetén a primer reverz komplementerét jelöltük. A leginkább a középső régióban megfigyelhető, különböző csoportokra jellemző *indel*-ek miatt a nevezett primerpárral potenciálisan eltérő méretű (266-302 bp) transzkriptum-szakaszok is amplifikálhatóak.

Totál RNS-kivonatainkat oligo(dT)<sub>18</sub> primerrel, a nagy GC-arány miatt 1 % DMSO-t is alkalmazva írtuk át cDNS-sé. A reverz transzkripciót PCR követte (primertapadási hőmérséklet: 55 °C, 45 ciklus mellett), melynek eredményeként mind a négy mintánkban (TcK, TcF, Lr9K, Lr9F) a várható

méretű PCR-termékeket kaptuk (26. ábra), amelyeket templátként újra felhasználva ismételt PCRrel is megerősítettünk.

A termék(ek) hosszára 266 és 302 bp között számítottunk, mivel a primerek tervezéséhez választott 16, lényegében 3 főbb ágba tartozó kitináz szekvencián úgy kerestünk konszenzus szakaszokat, hogy a majdani köztes régióban esetlegesen fennálló, jellegzetesebb inszerciók ill. deléciók ("indel"-ek) miatt a kapott termék típusára méretéből is következtethessünk.



26. ábra: A TaeChi4 primerpárral, oligo (dT)18-s átírást követő (RT-)PCR során amplifikált termékek (4 d.p.i.) (Tc: fogékony 'Thatcher' fajta; Lr9: rezisztens Lr9 vonal; K: kontroll; F: fertőzött; 4 d.p.i.: a fertőzést követő 4. nap) A kapott termékek mérete egységes, a várható terméktartomány alsó szakaszába esik (~270 bp), kiugró expressziós intenzitásváltozás a rezisztens Lr9 vonal fertőzött mintájában észlelhető.

A kapott termékek mérete a két genotípus kontroll és fertőzött mintáinál egységesen, ~270 bp körülinek adódott, de intenzitásukban jelentős eltérést mutattak. Úgy tűnik, az érzékeny Tc fajtára jellemző, relatíve magasabb kitináz alapszint a kórokozó behatolására nem mutat érdemi változást 4 nappal p.i., a rezisztens Lr9-ben viszont a fertőzés hatására még a Tc-ben megfigyelt szintet is meghaladó, ugrásszerű expressziós növekedés figyelhető meg.

A négy mintából izolált Chi4 klónok szekvenálása meglepő eredményekre vezetett:

(1) A kapott szekvenciák mindegyike – a PCR termékek mérete alapján is sejthető módon – a nagyobb deléciókat tartalmazó, azaz rövidebb, de egymástól érdemben különböző két ág valamelyikébe tartozott. Emögött, az elongáció meglehetősen széles időkerete miatt feltehetőleg a kisebb inszertek preferenciális felvétele állhat.

- (2) A TaeChi4 primerpárral amplifikált szekvenciákat három típusba sorolhatjuk:
  - (a.) Megtaláltuk az amplifikált régióra nézve 100%-os illeszkedéssel annak a keresett *Chi1* génnek a transzkriptumát (AB029934), amelyet korábban fehérje-szinten, mint chitinase 1

(BAB82471) már Thatcher-alapú vonalaink mindegyikének fertőzött mintáiból kimutattunk (12.A ábra/'2a,b', 12.B ábra/'2x, 3x ill. '7,8' sáv és 7. táblázat). A megfelelő klónok a fertőzött Lr9-ben intenzív jelet adó Chi4 PCR termékből származtak.

- (b.)Hasonlóan, a szekvenált régió teljes hosszára nézve nukleotid-eltérés nélkül igazoltuk a keresett Chi IV transzkriptumát (AF112966), amelyet korábban, proteomikai vizsgálattal chitinase IV precursor-ként (AAD28733), a fertőzött Lr9-ben azonosítottunk kis lefedettséggel, a szekvenciálisan külön ágon elhelyezkedő chitinase 1-gyel komigrálva (12.B ábra/'7' sáv és 7. táblázat). Mivel azonban az illeszkedő inszertek szekvenciáit nem fertőzött, hanem kontroll (Tc) mintából klónoztuk, ez az eredmény nem támasztja alá a gén proteomikai alapon feltételezett patogén-indukálhatóságát.
- (c.) Egy újabb, a keresett Chil transzkriptumhoz (AB029934) igen hasonló szekvenciát szintén azonosítottunk, amely azonban elszórtan több pozícióban is nem szinoním szubsztitúciókat visel az amplifikált szekvenciarészlet teljes hosszán. A megfelelő cDNS-t a fertőzött Tc-ből és a kontroll Lr9-ből is klónoztuk. A szubsztituciók egyike a fragmens középső régiójában egy jellegzetes nukleotidcsere: a rokon szekvenciák legtöbbjében jelentkező TAC kodont TAA helyettesíti. Amennyiben a klónoknak megfeleltethető génvariáns mRNS-e a transzláció idejére is megőrzi a rokon géntermékekkel egyező leolvasási keretét az amplifikált régióban, akkor ezen, a homológokban a fehérje középtáján található helyen egy Stop-kodon keletkezik, ami a kódolt fehérje működőképességét veszélyezteti. Ugyan létezik egy másik értelmes leolvasási keret is a klónozott régióra, az így kapott aminosavszekvenciára homológokat keresve azonban az NCBI fehérjeadatbázisa mindössze két, szintén levezetett, emiatt kis megbízhatóságú kitináz szekvenciát ad ki találatként – egy kukorica hypothetical protein-t (NP\_001143278) ill. egy árpa chitinase2-t (BAC87786), aminosav-szinten csekélyebb azonosságú (61 % ill. 89 %) ill. csak rövidebb szakaszra (70/73 ill. 36/73) érvényes homológok képében. Az azonosított 2-2 Chi4 klónból feltételezhető, egyedi génvariáns valódiságát erősíti, hogy két különböző vonal eltérően kezelt mintájából is azonos szekvenciát klónoztunk, illetve, hogy saját Chi4 klónjainkon kívül ez a szekvencia - a TIGR BLAST lehetőségeit kimerítve – a CV762827 klónra is 100 %-ban illeszthető. Szerepéről vagy esetleges további éréséről eddigi eredményeink alapján érdemi információ nem adható.

## 5.1.3.3. Levélrozsda indukált glükanáz és kitináz izoformák kezdeti génexpressziós vizsgálatai

Eddigi klónjaink analízisének eredményei alapján feltételezhető, hogy a glükanázokra tervezett primerpárok közül a TaeGlu3 (és esetleg a TaeGluF5-R4), a kitinázokra specifikus indító szekvenciák közül pedig a TaeChi3 primerpár kellően szűk specificitású és egyszersmind olyan transzkriptumrészletek amplifikálására alkalmas, amelyek génjei közel rokon, funkcionálisan is jól behatárolható, ismert szekvenciákkal rendelkeznek. Abból a célból, hogy felmérjük, az általuk célzottabban vizsgálható kitináz és glükanáz géncsoportok expressziós dinamikája összefüggésben állhat-e az általános apoplasztikus kitináz ill. 1,3-glükanáz aktivitásgörbék genotípus-függő különbségeivel, időbeli kifejeződésüket első közelítésben durvább felbontásban, normál RT-PCR-rel teszteltük, az eltérő válaszadó-képességű Tc és Lr9 vonal fertőzött mintáinak összevetésével (0, 1, 3, 4 és 7 nap p.i.).



27. ábra: Glükanázok és kitinázok meghatározott köreinek expressziós változása a levélrozsdafertőzést követő egy hét során a Tc és Lr9 genotípusok fertőzött mintáiban. Az amplifikáció specifikus - TaeGlu3, TaeGluF5-R4 ill. TaeChi3 - primeres RT-t követő normál PCR-rel történt (57 °C, 54 °C ill. 57 °C; 40 ciklus). A párba rendezett betűk a Tc (a, c, e, g, i) és az Lr9 vonal (b, d, f, h, j) fertőzött mintáit képviselik, az inokuláció időpontjától számított 0-7. napon. M: 100 bp-os DNS marker; (+): PCRpozitív kontroll; (-): templátmentes kontroll. A két genotípusban kapott PCR termékek intenzitásának időbeli eltérései alapján eltérések feltételezhetőek a megfelelő glükanáz ill. kitináz géncsoportok indukciós dinamikájában.

Általánosságban, a fertőzött Tc ill. Lr9 vonalakban a TaeGlu3, TaeGluF5-R4 és TaeChi3 primerpárokkal kapott PCR termékek intenzitáskülönbségei (27. ábra) alapján - megfelelő referenciagén hiányában a cDNS mennyiségére normálva - egyelőre csak arra következethetünk, hogy az azonosított 1,3-glükanáz-ágak, illetve kitináz-csoport tagjai a fertőzést követően mind a rezisztens Lr9-ben, mind pedig a fogékony Tc vonalban igen korán és meglehetősen intenzíven indukálódnak, később azonban az expresszió időbeli lefolyását és erősségét tekintve is különbségek jelentkeznek a két genotípusban. Eszerint, a gélképek alapján  $(1\rightarrow 3 \text{ d.p.i.})$  úgy tűnik, hogy az indukált gének expressziója a Tc-ben hamarabb lecseng (érdemben gyakran már a korábban klónozásra választott időpontra), míg az Lr9-ben hosszabb ideig fennmarad. A vizsgált hét második felében, (4 d.p.i.) megfigyelhető expressziós intenzitások a két genotípus kontroll és fertőzött mintáiban ugyanakkor egyik géncsoportot tekintve sem könnyen interpretálhatóak eddigi eredményeink alapján, ezért feltételezéseink megerősítésére további kísérleteket tervezünk.

Nyilvánvaló, hogy a kérdés az érzékenyebb és jobb felbontású kvantitatív, valós idejű RT-qPCR nélkül nem tisztázható, de a TaeGluF5-R4 primerpár alkalmazhatósága az analízisben, a primertervezés alapján feltételezett, szélesebb specificitása miatt (vö. 6. táblázat és 4.4.3.1. ill. 5.1.3.1.2 fejezet) egyelőre nem egyértelmű. Megfelelő normalizálás mellett, szemi-kvantitatív RT-PCR eredményeinkre alapozva viszont a TaeGlu3 ill. TaeChi3 primerpárral azonosított 1,3-glükanáz- és kitináz-ág expressziójának valós idejű, érzékenyebb követését a közeljövőben tervezzük. A glükanáz- ill. kitináz-specifikus reverz transzkripcióra esetükben egyelőre mindenképpen szükség van, mert oligo(dT)<sub>18</sub>-vel végzett RT-t követően eddig még egyik vizsgált búzavonal mintáiból sem sikerült PCR-terméket kimutatnunk az előzőleg említett endo-1,3-glükanáz ill. kitináz transzkriptumokra specifikusan tervezett primerek segítségével (ez alól csak az általános jellegű TaeChi4 ill. a TaeUbF4-R3 primerek kivételek). A sikertelenség háttérben a vizsgált géncsoportok bizonyos régióira kifejezetten jellemző nagy GC-arányt vagy egyéb, stabil másodlagos szerkezetet okozó tényező jelenlétét gyanítjuk.

### 5.2 Kadmium-kezelt árpa apoplasztjának elemzése

## 5.2.1 Kadmium-stresszel asszociált változások az árpa apoplaszt fehérjemintázatában

A kadmium-stresszel összefüggésben az árpa apoplaszt-fehérjemintázatának összehasonlító analíziséhez elsőként, közelítő céllal egydimenziós gélelektroforézist végeztük a ~10-120 kDa tartományban molekulatömeg-alapú szeparációt lehetővé tévő körülmények között (28. ábra).



28. ábra: Kadmium-kezelt árpa apoplasztfehérjék 1D-PAGE mintázata 1, 4 és 7 nappal a kezelés megkezdése után, 0-10-50-100-300 μM Cd<sup>2+</sup>-koncentrációknál. A kezelést követő 1. napon már észlelhetők változások, többségükben növekvő intenzitásban jelentkeznek és a 4. napra válnak szembetűnővé, míg a 7. napra már újabb, érdemi különbség nem látható. A számok (01, 02, 03 és 10) a tömegspektrometriai (MALDI-TOF) azonosításra küldött sávokat jelölik.

Már az 1D-PAGE mintázatban is fokozatosan erősödő, a tápoldat (1-10-50-100-300 µM) Cd<sup>2+</sup>koncentrációjának emelését tendenciózusan követő változásokat figyeltünk meg a szekretált fehérjék közt, amelyek egyrésze már a kezelés utáni 1. naptól kezdve nyomon követhető a 20-25 kDa régióban. A három felvételezési időpontot összehasonlítva a legdrasztikusabb mintázatbeli változások a kezelést követő 4. naphoz voltak köthetőek, ehhez viszonyítva, a 7. napon már csak kisebb mértékű progressziót tapasztaltunk. A változások többsége (pl. a 31, 23-25, 18, 15 és 13 kDa régiókban) intenzitásnövekedésre utalt. A kadmiumkoncentráció növekedésével párhuzamosan a kezelt növények apoplasztkivonatainak összfehérje koncentrációjában is jelentős növekedést figyeltünk meg: a 300  $\mu$ M [Cd<sup>2+</sup>]-val kezelt minta koncentrációja a kontrollhoz képest már 3-4-szer töményebb volt (0,3 $\rightarrow$ 1.0-1,2 mg/ml). A mintázat más régióiban ugyanakkor (pl. ~21, ~18 és ~14 kDa) gyengülő intenzitás is megfigyelhető volt a nehézfém koncentrációjának fokozódásával.

A MALDI-TOF alapú MS-analízisre a kadmium-kezelés 4. napjának apoplaszt fehérjemintáit választottuk, és az egydimenziós gélben kapott mintázatukból néhány egyértelmű, kadmium-kezeléssel összefüggésben jellemzően változónak ítélt, növekvő ill. csökkenő intenzitású sávot izoláltunk a gélből (28. ábra, '**01-03'** a 300  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>-os, '**10'** a kontroll mintából). A 25 és 15 kDa környéki, dominánsan változó régiókat egyelőre kihagytuk az analízisből.

A [01], ~31 kDa mérettartományú sávban a MALDI-TOF analízis endo-1,3-glükanáz(ok) nyomait azonosította. A peptidtömeg-ujjlenyomat analízisből levezetett triptikus szekvenciák egyenlő mértékben illettek egy szekretált **endo-1,3-beta-glucanase** (1607157A) árpafehérjére, valamint az árpa **Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII** prekurzor proteinre (P15737) ill. egy utóbbival teljes mértékben megegyező, nukleinsavból levezetett **beta-1,3-glucanase II** (AAM75342) árpaszekvenciára (a 20 % ill. 18 %-os szekvencia lefedettség különbségét előbbi fehérje szignálpeptid-mentessége magyarázza). A gél alapján, a sáv mobilitásából becsült molekulatömeg jól illeszkedett az érett formában szereplő 1607157A névleges értékéhez, s ehhez hasonló, M<sub>r</sub>: 32353 értéket kaptunk a P15737 és AAM75342 esetében is – a prekurzor szignálpeptidjének levágása után. Különbségtételre a 1607157A és P15737/AAM75342 között egyébként is csak az érett formák 194. aminosav pozíciójában elhelyezkedő poláros S (Ser)  $\leftrightarrow$  erősen bázikus R (Arg) csere adna lehetőséget, de ebből a régióból nem származott detektált peptidünk.

A kiválasztott fehérjesávok közül a **[02]** volt a legintenzívebb. Ebben a ~24 kDa mérettartományú sávban több, eltérő funkciójú árpa apoplaszt-fehérjét azonosítottunk (8. táblázat). Jelentős (40 %-os) szekvencia lefedettsége miatt elsőként, a búza referencia apoplasztban homológként már azonosított árpa **hypothetical protein**-t említjük (CAA74594), amelyet a növényi BSP-k (bázikus szekretált proteinek) közé sorolnak (Mr: 24274; pI: 8.56), és szakirodalmi adatok alapján szerepét a növényi védekezésben feltételezik. E *mellett* azonban egy, az előbbi proteinnel szekvencia alapján szorosan rokonítható, árpa **PR17c precursor** (ABV22582) is detektálható volt (6 %-os lefedettség), melynek (egyidejű) jelenlétét egy-egy, a két fehérjében nagy hasonlóságot, de eltérő triptikus hasítóhelyet mutató rövid peptid (*R.GT*ANGGLIEGIADYVR *vs.* QG*K*.ANGGLIEGIADYVR) párhuzamos kimutatása alapján valószínűsítjük.

8. táblázat: Az árpa (cv. Mandolina) apoplaszt egy-dimenziós PAGE fehérjemintázatában proteomikailag azonosított, erőteljes kadmiumstresszel asszociáltan megváltozott mennyiségű apoplasztfehérjék (4. nap p.t. 300 μM Cd<sup>2+</sup>).

Sáv	MS-azonosított protein	Accession	Taxon	Névleges tömeg;	Szekvencia
(+/-)	(NCBInr, Viridiplantae)	no.		kalkulált pl érték	lefedettség (%)
01 (+)	endo-1,3-beta-glucanase (PR2 család)	1607157A	[Hordeum vulgare ssp. vulgare]	M <sub>r</sub> : <b>32321</b> pl: <b>8.52</b>	20 % (MALDI-TOF)
	Glucan endo-1,3-beta- glucosidase GII / beta-1,3-glucanase II (PR2 család)	P15737 / AAM75342 /	[H. vulgare ssp. vulgare]	M <sub>r</sub> : <b>35227</b> pl: <b>9.01</b>	18 % (MALDI-TOF)
02 (+)	Hypothetical protein (BSP család)	CAA74594	[H. vulgare]	Mr: <b>24274</b> pl: <b>8.56</b>	40 % (MALDI-TOF)
	PR17c precursor (PR17 család)	ABV22582	[H. vulgare ssp. vulgare]	Mr: <b>24431</b> pl: <b>8.93</b>	6 % (MALDI-TOF)
	<b>chitinase</b> (PR3 család)	CAA55345	[H. vulgare ssp. vulgare]	Mr: <b>26898</b> pl: <b>6.08</b>	20 % (MALDI-TOF)
	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (precursor) (PR1 család)	P35793	[H. vulgare]	Mr: <b>18028</b> pl: <b>8.93</b>	21 % (MALDI-TOF)
03 (+)	pathogenesis-related protein 4 (PR4 család)	CAA71774	[H. vulgare]	Mr: <b>16083</b> pl: <b>8.50</b>	33 % (MALDI-TOF)
	Barwin (PR4 család)	P28814	[H. vulgare]	Mr: <b>14071</b> pl: <b>7.77</b>	36 % (MALDI-TOF)
10 (-)	Ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit	YP_874661 < P05698.2	[H. vulgare ssp. vulgare]	Mr: <b>53672</b> pl: <b>6.22</b>	n.a. (MALDI-TOF)

A [02] foltban azonosítottunk továbbá, 20 %-os szekvencia-lefedettséggel egy enyhén savas árpa **chitinase**-t (CAA55345), amely jósolt szignálpeptidje hasítását követően már valóban az izolált molekulatömeg-tartományba illeszkedhet (Mr: 26 898  $\rightarrow$  24 703). Végül, ebben a molekulatömegrégióban nem várt találatnak tűnik, de 21 %-os lefedettsége miatt mégis említendő az adatbázisban prekurzorként megnevezett **Pathogenesis-related protein PRB1-3** (syn. PR-1B / HV-8) (P35793) 102
azonosítása. A bizalmatlanságot az okozza, hogy a PR1-típusú, szignálpeptidet is tartalmazó prekurzor aminosav szekvenciából számított névleges tömege is csak M<sub>r</sub>: 18028, az érett, szekretált formának pedig, a klasszikus PR1 fehérjékhez illeszkedve még kevésbé itt, hanem kb. a 15 kDa régióban volna helye. A tévedés lehetőségét ugyanakkor gyengíti, hogy a rozsdafertőzéses kísérletben indukálódott, közel rokon PR1.1 búzafehérje (CAA07473) egydimenziós elválasztásánál szintén hasonló molekulatömeg-anomáliával szembesültünk (ld. 5.1.1 fejezet). A várt és a megfigyelt méretek ilyen jelentős eltérésére egyelőre nincs magyarázatunk, bár, például a fehérje jelentős mértékű glükozilálása vezethet ilyen látszólagos méretkülönbséghez. Az O- ill. N-glikozilációs helyek predikciója (YinOYang 1.2, NetNGlyc 1.0) mindenesetre egy N-glikozilációs helyet (sequon: NLS) nevez meg a 20. aminosav pozíciójában, amely alkalmas lehet az oligoszacharid-kötőhely biztosítására, az izolált gélsávban mutatkozó vörösesbarna festődés pedig szintén glükoprotein(ek) jelenlétére utalhat. A [02] sáv vonatkozásában tehát összességében azt kell megállapítanunk, hogy a sávot valószínűleg több komigráló fehérje alkotja, és ismereteink jelenlegi szintjén nem dönthető el, hogy közülük melyik/melyek indukálódtak a kezelés hatására. Erre a jobb elválasztást biztosító 2D-elektroforézissel keresünk választ.

A kadmium-kezelés 4. napján izolált minta [03] jelű, ~ 18 kDa régiójú sávjában, 30-40 %-os lefedettségi átlaggal a kitinkötő ill. esetenként kitináz aktivitású PR4 család két, egymással jelentős mértékben rokonítható képviselőjének párhuzamos előfordulását detektáltuk, a **pathogenesis-related protein 4** (CAA71774) és a **Barwin** (P28814) árpafehérje alakjában. A PR1-nél már taglalthoz hasonló probléma azonban itt is felmerült: az adatbázisban még szignálpeptiddel szereplő CAA71774 névleges tömege szerint is csak 16 kDa, talált PR4 fehérjéink pedig érett alakjukban már megközelítőleg 14 kDa méretűek, tehát itt is jelentős glikoziláltságot kellene feltételeznünk. Az alkalmazott, glikozilációs pozíciót tesztelő (YinOYang 1.2, NetNGlyc 1.0) programok alapján azonban nem sikerült megfelelő glikozilációs helyeket azonosítanunk a két szekvenciában.

A [10] jelű, kontrollból (4 d.p.t) izolált sávban (~14 kDa) a kadmium-kezeléssel összefüggésben egyre csökkenő indukciójú apoplaszt proteinek jelenlétét feltételeztük. Azonban az azonosított peptidek mindegyike a RuBisCO enzim plasztiszban kódolt nagy alegységének eltérő fragmentumaival egyezett.

A méret alapján, 1D-PAGE révén szeparált és azonosításra küldött sávok MS-analízise, a rendszer korlátaiból adódóan sávonként általában egynél több fehérje jelenlétét mutatta ki, ezért áttértünk a kétdimenziós elválasztásra. A töltés szerinti elválasztást széles pH intervallumban (3-10 NL) végeztük, az extrém savas vagy bázikus fehérjék régióját kevésbé reprezentálva, előbb 7, majd 13 cm-es stripeken, a felbontás további javítása érdekében. A két-dimenziós analízishez a

legtöményebb (300  $\mu$ M) kadmium-kezeléses mintákat használtuk fel, annak ellenére, hogy szakirodalmi adatok szerint *in vivo* körülmények közt a [Cd<sup>2+</sup>] legtöbbször nem haladja meg az 50  $\mu$ M-t. A döntést az indokolta, hogy feltételeztük, egy extrém Cd<sup>2+</sup> koncentráció érdemben nem változtatja meg az alapvetően mérsékeltebb nehézfém-stresszre adaptálódott stresszválasz jellegét ill. az abban közreműködő fehérjéket, de láthatóbbá teszi az anyagcserefolyamatok eltolódásának irányultságát. Erre az 1D-analízisben tapasztalt tendenciák is reményt adtak.

A fehérjemintázat változásait módszertani okokból elsősorban a 10-40 kDa közti régióban vizsgáltuk. A változásban sűrűn érintett régiókat a 29. ábrán körökkel keretezve jelöltük.



kontroll - 0 μM Cd (4 d.p.t) kezelt - 300 μM Cd

Az érintett régiókból egy-egy kiválasztott folt tömegspektrometriai analízisével első körben az volt a célunk, hogy megerősítsük ill. egyértelművé tegyük a fentiekben leírt, 1D elválasztás után kapott eredményeinket. Emiatt a találatokat az előbbieknek megfelelő, csökkenő molekulatömeg szerint fogjuk tárgyalni (9. táblázat).

**<sup>29.</sup> ábra: Kadmium-kezelt árpa apoplasztfehérjék összehasonlító, 2D-PAGE mintázata**. A kezelés megkezdését követő 4. napos minták közel 40, a kezeléssel asszociáltan változó intenzitású folt-párja közül a képen betűkkel azokat tüntettük fel (alsó index: <sub>0</sub> – kontroll; <sub>C</sub> – kezelt), melyek valamely tagján MS-analízist is végeztünk.

9. táblázat: Az árpa (cv. Mandolina) apoplaszt két-dimenziós fehérjemintázatában proteomikailag azonosított, erőteljes kadmiumstresszel asszociáltan megváltozott mennyiségű apoplasztfehérjék (kezelés: 300 μM Cd<sup>2+</sup>; 4. nap p.t.).

Folt	MS-azonosított protein	Accession no.	Taxon	Névleges tömeg; kalkulált pl érték	Szekvencia lefedettsé <u>g</u> (%)
(+/-)	(NCBINF, Viridiplantae)				
Wc	endo-1,3-beta-glucanase	1607157A	[H. vulgare ssp.	M <sub>r</sub> : 32321	<b>55</b> % (MALDI-TOF);
(+)	(PR2 család)		vuigarej	pl: 8.52	61 % (LC-MS/MS)
	Glucan endo-1,3-beta-	P15737 /	[H. vulgare ssp.	M <sub>r</sub> : 35227	57 % (MALDI-TOF);
	beta-1,3-glucanase II		vugarej	pi: <b>9.01</b>	<b>37</b> % (LC-IVIS/IVIS)
	(PR2 család)				
Bc	chitinase	CAA55345	[H. vulgare ssp.	Mr: 26898	71 % (MALDI-TOF);
(+)	(PR3 család)		vulgare]	pl: <b>6.08</b>	22 % (LC-MS/MS)
Zc	chitinase	CAA55344	[H. vulgare ssp.	Mr: 27377	<b>76</b> % (MALDI-TOF);
(+)	(PR3 család)		vuigarej	pl: <b>8.74</b>	41 % (LC-MS/MS)
Xc	hypothetical protein	CAA74594	[H. vulgare]	Mr: 24274	66 % (MALDI-TOF)
(+)	(BSP-csalad) BLAST: PR17c prekurzor			pi: <b>8.96</b>	41 % (LC-IVIS/IVIS)
	Barnerm1	44B71680	[H_vulgare]	Mr <sup>.</sup> 22554	50 % (MALDI-TOF)
	(PR5 család)		[i i. vaigaroj	pl: 8.15	38 % (LC-MS/MS)
	thaumatin-like protein	AAK55325	[H. vulgare]	Mr: <b>24541</b>	45 % (MALDI-TOF)
	TLP7			pl: <b>7.36</b>	34 % (LC-MS/MS)
	(PR5 család)				
Yc	thaumatin-like protein	AAK55325	[H. vulgare]	Mr: 24541	<b>73</b> % (MALDI-TOF);
(+)	(PR5 család)			pl: <b>7.36</b>	62 % (LC-MS/MS)
	Barperm1	AAB71680	[H_vulgare]	Mr <sup>.</sup> 22554	68 % (I C-MS/MS)
	(PR5 család)		[	pl: <b>8.15</b>	
	thaumatin-like protein	AAK55326	[H. vulgare]	Mr: <b>25213</b>	53 % (MALDI-TOF);
	TLP8			pl: <b>7.83</b>	24 % (LC-MS/MS)
	(PR5 család)				
Qc	PR-1a pathogenesis	CAA52893	[H. vulgare ssp.	Mr: 17771	69 % (MALDI-TOF)
(+)		VD 074004 /		pi: 8.19	>60 % (LC-MS/MS)
	hisphosphate	P05698 2	[H. vulgare ssp. vulgare]	Mr: 53672	9 % (LC-IVIS/IVIS)
(-)	carboxylase / oxygenase	1 00000.2	raigaroj	pi. <b>0.22</b>	
	large subunit				
	ribulosebiphosphate	CAA90005	[H.	Mr: 45761	16 % (MALDI-TOF)
<u> </u>				pi: 6.28	
	ribulose-1,5- bisphosphate	AAN2/973 / AAX44964	[H. erectifolium]	Mr: 53285	28 % (MALDI-TOF)
(*)	carboxylase / oxygenase	VD 87/661		μι. υ. ιο Μ · 53672	13 % (I C MC/MC)
	large subunit	17_0/4001	vulgare]	pl: 6.22	13 /0 (LU-IVIO/IVIO)
			÷ .	F •	

A 30-35 kDa közti mérettartomány egy enyhén savas, valamint egy bázikus régióban ( $W \rightarrow Wc$ ) tárt fel kadmium-indukált koncentrációnövekedést. Mivel az 1D-PAGE (01 sávja) a ~31 kDa méretben, bázikus endo-1,3-glükanázok kifejeződésének erősödését már valószínűsítette, a bázikus Wc foltot analizáltuk.

Két tömegspektrometriai eljárás (MALDI-TOF és LC-MS/MS) párhuzamos bevonásával nyert eredményeink a [Wc] foltban megerősítették a 28. ábra '01' sávjánál kapott, s a 8. táblázatban már bemutatott eredményeket, de most, azonosított peptideink révén igen magas, 55-61 % lefedettséget bizonyítottunk a korábban már ismertetett két glükanáz szekvenciára (9. táblázat). (Mivel az adatbázisban szereplő Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (P15737) ill. a nukleinsav szekvenciából levezetett beta-1,3-glucanase II (AAM75342) aminosav sorrendje teljesen megegyezik, ezekre a továbbiakban egy proteinként hivatkozom.) Úgy tűnik azonban, hogy a kétdimenziós analízissel nyert szekvenciaadatok már lehetőséget adnak annak eldöntésére, hogy Wc foltból izolált fehérjénk ennek a (két adatbázis-elérhetőséggel is bíró) proteinnek, vagy a szintén magas lefedettséggel azonosított endo-1,3-beta-glucanase-nak (1607157A) feleltethető-e meg. A tömegspektrometriás analízis ugyan mind az 1D-, mint a 2D-elválasztás után egy nem triptikus Nterminális peptidet (-.IGVCYGVIGNNLPSR.S) mutatott ki, ezen az alapon azonban valójában nem tehető különbség a két szekvencia között, mert a nevezett peptid nemcsak az adatbázisban szereplő 1607157A N-terminusának felel meg, hanem a prekurzor jellegű P15737/AAM75342 proteinre is illeszkedhet, ha arról a szignál-szekvenciát lehasítjuk. Másrészt viszont, a MALDI-TOF két olyan, egymást a szekvenciában követő triptikus peptidet is detektált, amelyek – épp a 8. táblázat kapcsán már említett, jellemző egy aminosavnyi eltérést lefedve/határolva – az arginin jelenlétét igazolták a szerinnel szemben a 194. pozícióban. Ezt értékelve tehát az árpa P15737/AAM75342 beta-1,3glucanase II protein kadmiumstressz hatására bekövetkező indukciója tekinthető bizonyítottnak. Az 1607157A endo-1,3-beta-glucanase jelenlétét ugyan egyelőre nem zárja ki közvetlen kísérletes bizonyíték, azonban az érett fehérjeformák számított izoelektromos pontja alapján is a másik fehérje jelenléte valószínűsíthető. A ~300 aminosav hosszúságú, egyébként azonos szekvenciájú fehérjékben ugyanis az Arg→Ser csere az izoelektromos pontban is eltolódást okoz (pI: 8.83-ról 8.52 értékre), ami viszont más, vizsgált fehérjéinkhez is nagyon közeli pI-t eredményezne. Ezzel szemben azonban, ténylegesen a Wc tűnik az analizált gél legbázikusabb vizsgált proteinjének (29. ábra). A kérdést – kísérleti úton – lúgos tartományban végzett, nagyobb felbontású (6-11) és pI markerekkel segített izoelektromos fókuszálással lenne tisztázható.

A következő, ~25 kDa régióban, bár már korábban is jelentős változásokat tapasztaltunk a kadmium-kezeléssel összefüggésben, a mintázat megfelelő sávjának túlzott intenzitása miatt nem próbálkoztunk 1D-PAGE szeparációt követő MS-azonosítással (vö. 28. ábra). Ez a mérettartomány

a 2D-géleken mind savas (B vs. Bc), mind pedig lúgos tartományban (Z vs. Zc és környezete) mennyiségi növekedést tárt fel.

A [Bc] folt a már a [02] sávban többek közt azonosított savas chitinase (CAA55345) fehérjét erősítette meg 71 % (MALDI-TOF) ill. 22 % (LC-MS/MS) szekvenciális lefedettséggel.

A megfelelő mérettartományú lúgos régióban MS-azonosításra a gyengébb intenzitással a kontrollban is látható [**Zc**]-t választottuk a foltsorozatból, amely a savas CAA55345 kitinázzal közeli rokonságban álló, de bázikus árpa **chitinase**-t (CAA55344) reprezentálja, szintén kiemelkedő szekvencia-lefedettséggel (76 % - MALDI-TOF; 41 % - LC-MS/MS). A két szekvencia közti hasonlóság ellenére, a tömegspektrometriai elemzések egy-egy aminosavnyi eltérést hat különböző pozícióban is kimutatva meggyőzően erősítették meg a két foltban azonosított kitináz keltérő voltát. Adatbázisban szereplő szignálpeptidjük lehasadását követően mindkét kitináz kalkulált molekulatömege jól illeszkedik az adott folt gélen becsült pozíciójához (molekulatömeg szerint Bc:  $26,9\rightarrow$ 24,7; Zc:  $27,4\rightarrow$ 24.8 kDa; a pI változása pedig Bc-nél:  $6.08\rightarrow$ 5.65, Zc-re:  $8.74\rightarrow$ 8.60.) A bázikus Zc környezetében kadmiumkezelés kapcsán feltűnő egyéb foltok mibenlétéről egyelőre nincsen információnk, de vízszintes sorozat jellegű elhelyezkedésük alapján ("train"-ek?) ésszerű a lúgos kitináz enzim izoformáinak jelenlétét feltételeznünk.

A Zc folthoz közeli [**Xc**] foltban két, szerkezetileg és funkcióját tekintve is eltérőnek tekinthető fehérjecsalád képviselőivel találkozunk. Egyrészt, itt is azonosítottuk az 1D-PAGE azonos mérettartományából, a [02] sávban már kimutatott árpa **hypothetical protein**-t (CAA74594). (Az 1D-PAGE mintában szintén feltételezett, rokon PR17c fehérjét ugyanakkor itt nem detektáltuk.) A MALDI-TOF spektrum nemcsak a szekvencia C-végét (5 aminosav kivételével), hanem az N-terminális jelenlétét is közvetlenül azonosította (-.MKPQVATVAFFLLVTMAATAR.A), mely alapján egy ~24 kDa-s, azaz a találtnak megfelelő fehérje valószínűsíthető a foltban (Mr: 24274; pI: 8.56).

A másik fehérjecsaládot az [Xc] foltban a PR5 család tagjai, a taumatinszerű proteinek (TLP-k) képviselik. Ezeket korábban, a 1D-minták vizsgálata során nem detektáltuk. Az LC-MS/MS és a MALDI-TOF tömegspektrum alapján egyelőre nem lehet döntést hozni arról, hogy a foltban a **TLP7** (AAK55325) vagy a **Barperm1** (AAB71680) árpafehérje van-e jelen, mert a talált peptidek a két közel rokon fehérje bármelyikének jelenlétét nagy szekvencia-lefedettséggel magyarázzák (34 % vs. 50 % – LC-MS/MS; 45 % vs. 50 % – MALDI-TOF). Bár a két fehérje adatbázisban feltüntetett szekvenciájából kalkulált izoelektromos pontok jelentősen eltérnek egymástól (7.36 vs. 8.15), s a TLP7 névleges tömege is kissé nagyobb a gélből becsülhető értéknél, mindez nem elegendő a különbségtételre, hiszen csupán arra is utalhat, hogy a gélből már érett, szekretált formát

izoláltunk. Annál is inkább, mert a TLP7 fehérje NCBInr adatbázis szekvenciájából jósolt, valószínűbb szignálpeptidet lehasítva (N-terminus: -.ATITVVNR), az újrakalkulált izoelektromos pont ( $7.36 \rightarrow 7.91$ ) és tömeg (Mr: 21 565) is immár hasonló az adatbázisban vélhetően érett formában fellelhető Barperm1 (RSATITVVNR) értékeihez (pI: 8.15; Mr: 21 656).

Az [Y<sub>c</sub>] foltból izolált proteinek MALDI-TOF és LC-MS/MS analízisében talált valamennyi peptid jelenléte már akkor is értelmezhető, ha a foltban mindössze két PR5 fehérje, az X<sub>c</sub> folt kapcsán már taglalt TLP7 (AAK55325) érett formája és a TLP8 (AAK55326) protein van jelen. Mindkét fehérjét nagy lefedettséggel (9. táblázat), együttes jelenlétüket pedig homológ szekvenciarészleteik négy régiójában kimutatott eltérések által nagy biztonsággal igazoltuk. A TLP7 fehérje azonosítására alkalmazott peptidek többsége (10 triptikus peptid) illeszkedik ugyan az Xc-ben már detektált **Barperm1** fehérjére (AAB71680) is, de a Barwin 1-ben nem fordul elő a MALDI-TOF által igazolt C-terminális peptid (K.DDQTSTFTCPAGTNYQIVLCP.-, Leu↔Phe csere) és az LC-MS/MS CID-spektrumából nyert N-vég peptid (-.ATITVVNRCSYTVWPGALPGGGVR). Utóbbi alapján egyébként nyilvánvaló, hogy a foltban szekretált fehérjeforma van jelen, de minden valószínűség szerint az nem a Barperm1, mert annak (feltételezetten) érett formája már ismert, ami pedig az N-végén 2 aminosavval hosszabb (-.RSATITVVNR), mint a kísérleteinkben azonosított peptid.

Az eredmények fenti elemzése jól tükrözi, hogy a kétféle MS-azonosítás gyakran mennyire nem felesleges, hiszen amellett, hogy az LC-MS/MS szekvenciális megerősítéssel (CID) szolgál a MALDI-TOF technológiával szemben (amennyiben utóbbi PSD-spektrum felvételekkel nem megerősített), a készülékek, pl. eltérő ionizációs stratégiájuk révén részben eltérő peptidek detektorba jutását is támogathatják, így szinergisztikusan növelhetik a találati biztonságot. Konceptuális transzlációval, cDNS-klónokból levezetett adatbázisszekvenciákkal dolgozva azonban (mint előbbi, kérdéses proteineknél is) a bizonyosság soha nem lehet teljes.

A TLP7 fehérje párhuzamos azonosítása az Xc és Yc foltokban utalhat a közeli foltok gélből való izolálásakor bekövetkezett kontaminációra. Az intenzív jelek alapján azonban valószínűbbnek tartom, hogy a két foltban valójában a TLP7 fehérje eltérő izoformáit vagy egy előbbivel közeli rokon (pl. a Barperm1-hez hasonló, de szekvenciájában attól kissé különböző) fehérje nyomait találtuk. Ezt valószínűsíti az is, hogy az Yc-ben szintén azonosított TLP8 – SignalP által jósolt, érett formájában – már kissé bázikusabb (pI:  $7.83 \rightarrow 8.15$ ) izoelektromos ponttal rendelkezik az adatbázisban szignálpeptiddel szereplő TLP7 protein N-véggel is megerősített, szekretált alakjához képest (pI:  $7.36 \rightarrow 7.91$ ).

A 2D-gél bázikus felén a kisebb, 10-15 kDa molekulatömeg-tartományba haladva egy újabb foltcsoport különíthető el, amelynek intenzitásában növekedést tapasztaltunk a kadmium stresszel összefüggésben (29. ábra). A régión belül egyelőre 2 foltot (Qc és Πc) analizáltattunk.

A [**Qc**] foltban, amely a 14-15 kDa méretű és az Xc / Yc foltoknak megfeleltethető töltésű (pI~8.0) fehérje régiót érinti, a **PR1 (Hv-1a)** árpafehérjét sikerült azonosítanunk (CAA52893) kiemelkedő szekvencia-lefedettséggel (69 % - MALDI-TOF; >60 % - LC-MS/MS). A fehérje névleges molekulatömege (Mr: 17771) ugyan nagyobb a gélből becsült értéknél, de az LC-MS/MS spektrum a pyro-Glu-ná alakult N-terminális glutaminnal igazolja a 24 aminosavnyi szignálpeptid lehasadását. Az érett, közel 15 kDa-nyi alakkal számolva már tömeg szerint is jó egyezést találunk a tapasztalt mobilitással, a töltés azonban érdemben nem változik (pI:  $8.19 \rightarrow 8.24$ ).

A kadmium-kezelt mintából izolált, ~12 kDa tömegű  $[\Pi_c]$  foltban egyik MS-analízis révén sem sikerült ismert apoplaszt fehérjét azonosítanunk. A detektált, kis intenzitású peptidek jórésze (pl. MALDI-TOF: 20/28) az ICF-be legvalószínűbben szennyeződésként jutott RuBisCO enzim nagy alegységének középső szekvenciarégiójából származott. A C-terminális K.FEFAPVDTID.jelenleg ismert árpa **RuBisCO** peptid nem azonos а (YP\_874661/P05698.2) K.FEFETPVDTIDKKV.- végszekvenciájával, de megegyezik a rokon *H. erectifolium* RuBisCOjában (AAN27973/AAX44964) megtalálható C-vég peptiddel. Ebből arra következtethetünk, hogy a fajban vagy az egyes fajtákban többféle, eddig nem ismert izoforma is jelen lehet.

A kadmiumos mintákban gyengülő, kontroll [C] folt analízise is az árpa **RuBisCO** (pl. YP\_874661/P05698.2) nagy alegységének azonosítását eredményezte két kiterjedt, folytonos szekvenciarészlet alapján, de az apoplasztfehérjék azonosításához képest gyenge szekvencialefedettséggel. Mivel a lefedettség a fehérje N-végére és középső régiójára korlátozódott, elképzelhető, hogy a detektált ~17 kDa (pI: ~5.6) bomlástermék a ~54 kDa nagy alegység egyszeri hasításával keletkezett. Az így létrejövő fragmens kalkulált tömege 17 681 kDa, azaz a fehérje tényleges mobilitásával megegyezik, bár a pI (4.83) jelentősen alatta marad a megfigyelt értéknek. Az eltérést magyarázhatná egy az YP\_874661-től részlegesen eltérő RuBisCO szekvencia, hiszen a RubisCO-ként azonosított szekvenciarészletek (pl. MALDI-TOF: 10/23 peptid) rokon fajok (*H. erectifolium, H. brachyantheum*) RuBisCO szekvenciáíra (pl. CAA90005) is jól illeszthetők.

### 5.3 Búza referencia-apoplaszt térképezése

### 5.3.1 Referencia apoplaszt proteomikai analízise

A 'Chinese Spring' egészsége, s búza csíranövényből izolált intercelluláris folyadék egy- és kétdimenziós PAGE-analízise alapján elmondható, hogy a választott kivonási és elválasztási mód, és a festési eljárások (CBB és ezüstfestés) lehetőségei és korlátai között, a pI: 3-10 izoelektromos pont és MW:~10-100 kDa molekulatömeg tartományban az apoplasztfehérjék sokfélesége az irodalmi adatokkal (Lee *et al.* 2004, Wen *et al.* 2007) megegyezően esetünkben is pár százas nagyságrendben maximálható (30. ábra).



30. ábra: 'Chinese Spring' búzafajta 7 napos csíranövénye levél-apoplasztjának 2D-PAGE fehérjemintázata. Kísérleti körülmények: A) 300 µg, B) 120 µg ICF fehérje; IEF: 26 kVh, 0,05 mA/strip, 4.5 W; 20°C, 3-10 NL IPG strip (13 cm), SDS-PAGE: 12,5 % Laemmli (17 cm) – a: CBB G-250, b: Ag-festés. A bejelölt és azonosításra küldött 21 foltból (A. ábra) 11-hez sikerült a szakirodalom alapján is egyértelműen szekretálódó és annotált búzafehérjé(ke)t ill. valamely gabonaféle homológjukat hozzárendelni (B. ábra; B1, B3, C1, Ex, F1, F5, G1, G2, G4, P2, Q1 foltok). Az azonosított fehérjék leírását a 10. táblázat tartalmazza.

A referencia mester gél elkészítése, és a gélek statisztikai értékelése folyamatban van, jelenleg 6 különböző izolátumból 14 gél futtatása történt meg. A 2D-poliakrilamid géleken, 300 µg fehérjét felvive kolloidális CBB-festést követően 57 db folt reprodukálható elválását tapasztaltuk. Az MS-azonosításra kivágott, eddigi 21 jelölt közül 20 folthoz sikerült legalább egy géntermékhez tartozó szekvenciát rendelni. Előbbiek közül 15 folt esetében kaptunk búza szekvenciát is (7 esetben az NCBInr búza protein adatbázis hiányosságai miatt csak az NCBI EST-adatbázisból), míg további 5 folt esetében leghasonlóbbként egyéb gabonafélék (*g. Hordeum, Oryza, Coix*) homológjait találtuk meg.

Az azonosított, és funkcionálisan is jellemezhető fehérjék közül 9-et ítéltünk az apoplaszt szempontjából egyértelműen relevánsnak, melyek 11 folttal voltak társíthatóak (10. táblázat). Ezek főként a növényi sejtfal-poliszacharidok lebontását, átalakítását végző enzimek, a herbivorok elleni védelemben résztvevő proteinek, a kórokozó sejtfal-poliszacharidokat is bontani képes enzimek ill. a multifunkciós fehérjék közé sorolhatók.

10. táblázat:	Α	Chinese	Spring	búza	apop	laszt	referenc	ia 2D-PAG	E mintá	izatá	ának eddigiekben
	az	onosított	fehérjé	i (NC	BInr	és	db[EST]	adatbázis;	Mascot	és	ProteinProspector
	programcsomag, SpektrumMill szerver) n.é.: nem értelmezhető										

Folt	MS-azonosított protein (NCBInr / db[EST])	Acc.no. (GB/SP)	Taxon	Névleges tömeg; kalkulált pl érték	Szekvencia lefedettség (%)
B1	arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II	AAK21880	[Hordeum vulgare]	Mr: 71999.09 Da pl: 5.22	10 % (LC-MS/MS)
B3	alpha-L- arabinofuranosidase / beta- D-xylosidase isoenzyme ARA-I	AAK38481	[Hordeum vulgare]	<b>Mr:</b> 81994.67 Da <b>pl:</b> 5.59	11 % (MALDI-TOF) 9 % (LC-MS/MS)
C1	beta-D-galactosidase ייי	Változó	[számos faj]	Mr: n.é.	fajtól függően
	TaLr1129C08R clone	BG904072	[T. aestivum]	<b>рі.</b> п.е.	26 % (LC-MS/MS)
Ex	alpha-amylase inhibitor / endochitinase* ناا	P15326	[Coix lacrima- jobi]	<b>Mr:</b> 14305.28 Da <b>pl:</b> 6.07	17 % (LC-MS/MS)
	WHE313_F04_F04ZS clone	BE425368	[T. aestivum]		13 % (LC-MS/MS)
F1	hypothetical protein	CAA74594	[Hordeum vulgare]	Mr: 24232.27 Da pl: 8.56	5 % (LC-MS/MS)
F5	(1,3;1,4)-beta-glucanase	CAA8049	[Triticum aestivum]	<b>Mr:</b> 34864.46 Da <b>pl:</b> 6.50	25 % (LC-MS/MS) 28 % (MALDI-TOF)
G1	adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase	CAC85479	[Triticum aestivum]	<b>Mr:</b> 21815.16 Da <b>pl:</b> 5.68	20-39 % (LC-MS/MS) 16 % (MALDI-TOF)
G2	(PR 16)				20-21 % (LC-MS/MS) 16 % (MALDI-TOF)
G4					15 % (LC-MS/MS)
P2	putative glucan endo-1,3- beta-D-glucosidase	CAI64809	[Triticum aestivum]	Mr: 34252.89 Da pl: 7.08	20 % (LC-MS/MS)
Q1	<b>beta-D-xylosidase</b> ill. TaE15008C02R clone	ABA92796	[Oryza sativa] [T. aestivum]	Mr: 83437.58 Da pl: 5.77	28 % (LC-MS/MS)

A növényi sejtfal-poliszacharidok átalakítását végző főbb enzimosztályok köréből xilanázok, arabino-furanozidázok jelenlétét sikerült igazolnunk három képviselővel (**B1**, **B3** és **Q1** folt), a búzával homológ árpa és rizs fehérjeszekvenciák szintjén. Ezek a búzafehérjék nagyobb molekulatömeg-tartományt képviselnek (>60 kDa), és töltésük szerint két csoportra bonthatóak: míg az **arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II** (AAK21880) ill. az  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase /  $\beta$ -D-xylosidase isoenzyme ARA-I (AAK38481) árpafehérjékkel homológ enzimeink [**B1** folt ill. **B1** << **B3** folt] savas jellegűek, addig a rizs  $\beta$ -D-xylosidase (ABA92796) búzahomológja [**Q1**] bázikusabb fehérje. A B3 foltban reprezentált ARA-I enzim homológ kettős funkciójú, nemcsak a xilánok  $\beta$ -1,4-glikozidos kötéseit, de az arabinán és xilán arabinofuranozil maradékainak  $\alpha$ -1,2 és -1,3 kötéseit is hasítja (31.A ábra).

A [B1] foltban (10 % szekvencia lefedettséggel) detektált AXAH-II, és a B3-ban nagyobb (2,5 % vs. 11 %) lefedettséggel igazolt ARA-I konzervált szekvenciák (Lee *et al.* 2001, 2003), de megfelelő búzafehérjéik egyelőre nem szerepelnek az adatbázisban. A BLAST-tal azonosított ARA-I homológ: *T. aestivum* putative beta-xylosidase (BAD06320, MW 61,8 kDa) szekvenciája nem egyezik az MS-spektrumokban mért adatokkal. Hasonló a helyzet a [Q1] foltban, 28 %-os szekvencia-lefedettséggel detektált *Oryza sativa* beta-D-xylosidase fehérjével. A BLASTP keresés során itt sem lehetett meghatározni a megfelelő homológ búzafehérjét, amely a fragmentációs spektrumoknak megfelelő és a MALDI-TOF tömegspektrumban detektált jelekhez hozzárendelhető szekvenciaszakaszokat tartalmazta volna. A dbEST adatbázisban való lekeresés (TBLASTN) azonban eredményre vezetett, a *T. aestivum* TaE15008C02R TaE15 Triticum aestivum cDNA clone TaE15008C02R, mRNA sequence (NCBI# [dbEST]: gil20442463, LOCUS BQ246587, MW 21,9 kDa) nyers transzlátuma, mint levezetett fehérje formájában.

További, sejtfal-módosításra képes enzimtípusként, a [C1] foltban számos faj beta-Dgalactosidase-ára illeszkedő, homológ peptidszekvenciákat találtunk, azonban BLASTP során ismét nem lehetett azonosítani megfelelő homológ búzafehérjét. A db[EST] adatbázisban való lekeresés során meghatározott, levezetett fehérje egy vélhetően nem komplett, poliA-mentes, s az Lr1 genotípusból 24 órával levélrozsdafertőzését követően izolált *Triticum aestivum* **TaLr1129C08R TaLr1 Triticum aestivum cDNA clone TaLr1129C08 5', mRNA sequence** (NCBI# [dbEST]: gil14311748, LOCUS BG904072, MW: 17,6 kDa) nyers transzlátuma volt, 26 %-os szekvencia-lefedettséggel. Az azonosított fehérjék második köre az elsőrendűen a patogén mikroorganizmusok ill. egyéb, pl. rágó kártevők elleni közvetlen védekezésben szereplő fehérjéket foglalja magába, Ezek közt leggyakrabban inhibitorok illetve a növényi védekezést stimuláló, ún. exogéb elicitor képző fehérjék és PR proteinek szerepelnek.

Az [Ex] foltban az LC-MS-MS mérés során kapott CID-spektrumok egy kínai vad gabonafélében, a Jób könnyében (*Coix lacryma-jobi*) leírt Alpha-amylase inhibitor/endochitinase (P15326, MW: 14,3 kDa) 4. szegmensét [Segment 4 of 6] - P15326\_4, MW: 8,1 kDa) azonosítottuk, de BLASTP-vel nem sikerült megfelelő, homológ búzafehérjét találnunk. A dbEST adatbázisban való lekeresés során talált búzaszekvenciánk a WHE313\_F04\_F04ZS Wheat unstressed seedling shoot cDNA library Triticum aestivum cDNA clone WHE313\_F04\_F04, **mRNA** sequence (NCBI#: [dbEST]: gil9423211, LOCUS BE425368, MW 22 kDa), 13 %-os szekvencia-lefedettséggel. Az azonosítás alapjaként szolgáló két, egymást érintő, összességében 21 aminosavnyi triptikus peptid: a K.KYYGR.G ill. R.GPIQISWNYNYGPAGR. utóbbi tagjában ugyanis két pozícióban is lehet eltérés, ahol az Ile az MS által nem detektálva átcserélődhetett Leura, továbbá a Coix szekvenciában a Trp (W)-nak megfelelő helyen valójában X, azaz nem azonosított aminosav szerepel. Ezért a lehetséges variánsok közül a GPLQISWNYNYGPAGR: számos kukorica (Zea) ill. köles (Sorghum) I. osztályos kitináz homológot, а **GPIQLSWNYNYGPAGR**: Lactuca és Medicago IV osztályú kitinázokat, a GPLQLSWNYNYGPAGR pedig Populus fehérjehomológokat ad ki. Feltételezzük, hogy búzafehérjénk inkább az utóbbi, egyszerűbb kitináz izoformákhoz sorolható. A Coix-szekvencia találati elsőbbségét zavaró módon inkább az okozhatja, hogy a publikált, de becslések alapján csak a monomer felét kitevő szekvencia viszonylag kisméretű (133 aminosav), különösen, hogy továbbá egy kisebb, 76 as-nyi szegmense önállóan is szerepelt az adatbázisban, így a relatív szekvencialefedettség aránytalanul megnőtt (16 %, sőt 28 %-ra) a többi homológhoz képest.

A hasonló molekulatömeg ill. pI tartományban található [P2] foltban az LC-MS/MS mérések CID-spektrumai egy búzafehérje, *Triticum aestivum* putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (CAI64809, MW 34.4 kDa) jelenlétét mutatták ki 20 %-os szekvencia lefedettséggel, melynek megnövekvő jelenlétét levélrozsdafertőzés kapcsán épp előbbi kísérleteinkben sikerült igazolni a Thatcher-alapú, Lr9 rezisztenciagént hordozó búzavonalban (16.B ábra/'5'). A MALDI-TOF-tömegspektrumban detektált 17 csúcsból 7 (41 %) illett a fenti fehérjére, négy további peptid más fajok glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase fehérjéihez volt rendelhető. A dbEST adatbázisban való lekeresés ismét 4 peptiddel, de előbbiektől egy esetben eltérő fragmentációs spektummal határozott meg egy közeli rokon *Triticum aestivum* putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase-t (NCBI# [dbEST]: 70968047, LOCUS DR739630, MW: 36,8 kDa). A szekvencia lefedettsége

ebben az esetben is 20 % volt. A vélhetően hiányos adatbázis miatt a megfelelő homológ búzafehérje tehát nem volt egyértelműen azonosítható.

Az [F5] folt LC-MS-MS mérései a *T. aestivum* (1,3;1,4)-beta-glucanase (CAA80493) fehérjét mutatták ki, 7 peptiddel és 25 % szekvencia-lefedettséggel. A MALDI-TOFtömegspektrumban a csúcsok 22 %-a (8/36) illett a fehérjére (28 % szekv. lef.), s N-terminális szignálpeptidjének lehasadása esetén (35  $\rightarrow$  32,1 kDa) a tapasztalt gélbeli mobilitással is megfelelő egyezést mutat.

Ismeretlen szerepű fehérjét is azonosítottunk: Az [F1] foltból izolált búzafehérje homológjaként az igen gyenge MALDI-TOF-tömegspektrum és egyetlen rövid, LC-MS/MS-sel meghatározott peptid (FDNAVGLAYSK) alapján, a Mascot és a SpektrumMill keresők is egyaránt találatként hozták ki a *H. vulgare* hypothetical protein-t (CAA74594, MW: 24,3 kDa), mely molekulatömege szerint meglehetősen jól illeszkedett izolált búzaproteinünkhöz, viszont, bár konzervált fehérjének mutatkozott, a BLAST-lekeresés nem azonosított homológ búzafehérjét, amelyik az igazolt peptidet is tartalmazta volna. Fehérjénk, szekvenciája alapján az ún. BSP szupercsalád tagja (növényi, ABA-indukált, bázikus szekretált proteinek), és komoly homológiát mutat a legújabban felfedezett PR17 család egyes képviselőivel. A BSP-k adatbázisa azonban egyelőre olyannyira hiányos, hogy az árpafehérje legközelebbi ismert búza homológja, a WAS-2 (AAD46133) a fragmentációs spektrumból ismert 11 aminosavnyi szakaszon 5(!) pozícióban mutat kisebb-nagyobb fokú eltérést.

Végül, az LC-MS-MS mérések során kapott CID-spektrumok és a MALDI-TOF, elsősorban a [**G1, G2** és **G4**] foltokban *T. aestivum* adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase (CAC85479, MW 22,0 kDa) jelenlétét igazolta. Ez a búzafehérje az apoplasztban domináns mennyiségben fordult elő, nyomait "szennyeződésként" három másik foltban [F5, K3, L1] is megtaláltuk.

ADP-glükóz pirofoszfatáz fehérjénk ugyanakkor, szekvenciájának elemzése alapján az árpában szintén konstitutívan kifejeződő germin-like protein 1-gyel (CAA75907 – Vallelian et al. 1998) és a germin-like protein 2a-val (ABG46233 – Zimmermann et al. 2006) volt leginkább rokonítható. Rizsben a germin-like protein 5-tel (AAC04836) találtuk a legnagyobb hasonlóságot (Membre és Bernier 1998, Haslam et al. 2003). Búzában ugyan a szekvencia-adatbázisok nem adtak ki homológ germinszerű proteint, a szakirodalmi adatok azonba mégis hozzásegítettek a rokonság tisztázásához. Segarra és mtsai (2003) ugyanis, egy hőstabil (70 °C) és proteolízisre is ellenálló ICF-frakció ellen poliklonális ellenanyagot termelve egy olyan domináns, oligomer fehérje 3

monomerjének jelenlétét bizonyították immunológiai úton, amelyek töltés és tömeg szerinti elrendeződése - 19 kDa (pI 5,8 és 6.2) ill. 21 kDa (pI 5.8) a 2D-PAGE-alapú Western-bloton, valamint dominanciája saját G1, G2 és G4 foltjainkkal mutatott feltűnő hasonlóságot (vö. 30. ábra). Ezt az új, 66-69 kDa aktív formájú N-glükoproteint, amely SOD aktivitása mellett szerin-proteáz inhibitor funkcióval is bírt, s expressziója gombafertőzéssel (*Septoria tritici*) volt befolyásolható, Segarra és mtsai arra alapozva írhatták le a germinszerű proteinek egy újabb képviselőjeként, hogy N-terminális szekvenálással a cupinokra jellemző A-, B- és C-boxok egyikét, az A-boxot is azonosították a Pigüé ill. Isla Verde fajtákból izolált, multifunkciós fehérjén (31. ábra).



31. ábra: A cupin szupercsaládba sorolt germinek és germinszerű fehérjék sémája. A halványkék háttér mérsékelt, a sötétkék (A, B és C box) erőteljes konzerváltságot jelez, a vörös háttér nagy variabilitást. C: a molekulán belüli diszulfid-hidat kialakító egy-egy Cys; H, H, E, H: a fémion-kötésben résztvevő aminosavak. pep: szignálpeptid, X: hidrofób aminosav. "KGD-RGD": állati, extracelluláris membrán interakciókban is szereplő motívum (KGD / RGD / KGE tripeptid) – germinekben nem található. (*Forrás*: Berner és Berna 2001)

Mivel tehát mind szekvenciális alapon, mind pedig az azonosítás alapjaként szolgáló három gélfolt [G1, G2 és G4] elhelyezkedése alapján is felmerült, hogy az azonosított fehérjénk azonos lehet a számos funkciót betöltő, s többek közt a PR16 család tagjait is adó germinszerű proteinek valamely képviselőjével, esetünkben, az azonosság megerősítéséhez szintén a GLP-kre jellemző A/B/C konzervatív boxok valamelyikének azonosítását tűztük ki célul. A fehérjét többféle enzimmel is hasítva (tripszin, kimotripszin, Glu C) végül a C boxot 5, a B-box jelenlétét pedig 1 fragmentációs CID-spektrum révén sikerült igazolnunk (11. táblázat).

11. táblázat: Összefoglaló táblázat a GLP konzervatív box-okat értelmező, G1, G2 ill. G4 foltban azonosított peptideinkről. Az azonosított, interakciós KGD-tripeptid vastagítva.

Peptid	B box	C box	CID-spektrum (LC-MS/MS)
R.LDIAVGGVVPLHTHPAASE.L	+		Jó
Y. <b>KGD</b> IM(O)VFPQGL.L		+	megfelelő
Y.QYNGGSSPAVAL.V		+	Jó
L.HYQYNGGSSPAVAL.V		+	Jó
Y.QYNGGSSPAVALVAF.S		+	Jó
Y. <b>KGD</b> IM(O)VFPQGLLHY.Q		+	Jó

Az általunk meghatározott B-box szekvenciája ugyanakkor 2 aminosavban eltért a Bernier és Berna (2001) által közölt G--P-H-HPRATEXXXX-G szekvenciától, R→A és T→S cserék következtében:

GVVPLHTHPAASE. Azonosítottunk továbbá egy KGD tripeptid motívumot (31. ábra, 11. táblázat), amely germinekben nem, de a germinszerű proteinek több mint felében előfordul (leginkább KGD vagy RGD, ritkábban KGE tripeptid alakban) és emellett egyes állati, extracelluláris sejtadhéziós proteinekben is általános, bár ott a motívum RGD-változata a jellemző (Bernier és Berna 2001).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

Os-gi 4239821 dbj BAA74702.1  Ta-gi 21322655 emb CAC85479.1  Ta-trans1_of_gi 32559049 gb CD875233 Ta-trans1_of_gi 32557901 gb CD874085	MAKAVMMLPVLLSFLLLPFSSMALTQDFCVADLTCSDTPAGYPCKASV MAN-AMLLPVLISFLIMPFSAMALTQDFCVADLSCSDTPAGYPCKAGV TRRAN-ARWLPALISFLIRPFSSRARTQDFCVADLACPDTPAGYPGKPGV	48 47 49
Os-gi 4239821 dbj BAA74702.1  Ta-gi 21322655 emb CAC85479.1  Ta-transl_of_gi 32559049 gb CD875233 Ta-transl_of_gi 32557901 gb CD874085	GAGDFAYHGLAAAGNT <b>S</b> NLIKAAVTPAFVGQFPGVNGLGISAARLDIAVG SAGDFYYHGLAAAGNT <b>S</b> NLIKAAVTPAFVGQFPGVNGLGISAARLDIA <b>M</b> G GAGDFYYHGLAAAGNTNNLIKAAVTPAFVGQFPGVNGLGISAARLDIA <b>G</b> G 	98 97 99 8
Os-gi 4239821 dbj BAA74702.1  Ta-gi 21322655 emb CAC85479.1  Ta-transl_of_gi 32559049 gb CD875233 Ta-transl_of_gi 32557901 gb CD874085	GVVPLHTHPAASELLFVTQGTVAAGFITSSSNTVYTRTLYAGDIMVFPQG GVVPLHTHPAASELLFVTEGTILAGFISSSSNTVYTKTLYKGDIMVFPQG GVVPLHTHPAASELLFVTEGTILAGFISSSSNTVYTKTLYKGDIMVFPQG HPPRPPSELLFVTEGTILAGFISSSSNTVYTKTLYKGDIMVFPQG ***	148 147 149 53
Os-gi 4239821 dbj BAA74702.1  Ta-gi 21322655 emb CAC85479.1  Ta-transl_of_gi 32559049 gb CD875233 Ta-transl_of_gi 32557901 gb CD874085	LLHYQYNAGQSAAVALVGFSGPNPGLQINDYALFANNLPSAIVEKVTFLD LLHYQYNGGSSAAVALVAFSGPNPGLQITDYALFANNLPSAVVEKVTFLD LLHYQYNGGSSPAVALVAFSGPNPGLQITDYALFANNLPSAVVETVTFLD LLHYQYNGGSSPAVALVAFSGPNPGLQITDYALFANNLPSAVVETVTFLD <u>*******</u> * *.*****	198 197 199 103
Os-gi 4239821 dbj BAA74702.1  Ta-gi 21322655 emb CAC85479.1  Ta-transl_of_gi 32559049 gb CD875233 Ta-transl_of_gi 32557901 gb CD874085	DAQVKKLKSVLGGSG DAQVKKLKSVLGG <b>S</b> G DAQVKKLKS <b>G</b> LGGTG-ALIKQAGL DAQVKKLKSVLGG <b>T</b> G-ALIKQAGLYARSSFILVSPCRITYLDDNTAREMV	213 212 222 152

(...)

32. ábra: A G1, G2 és G4 foltok CID-spektrumaiból levezetett peptidek illeszkedése egyes germinszerű (GLP) fehérjékhez (ClustalW, részlet). A kimerítő szekvenálások során igazolódott, hogy a legtöbb fragmentációs spektrumból levezethető peptidet (szürke háttér, sárgával a szekvenciális eltérést jelző aminosavak) nem az eredetileg megnevezett búza ADP-pirofoszforiláz enzim (CAC85479) magyarázza, hanem legalább egy, az adatbázisokban még nem szereplő, előbbivel közeli rokon fehérje, amelynek létére több, fehérje ill. EST adatbázisban szereplő búza (Ta) ill. egy rizs (Os) homológ megfelelő, egymást kiegészítő régióinak együtteséből tudunk következtetni. A vastag aláhúzások a GLP-kben konzervatív A, B- és C-box régiókat jelölik.

A konzervatív boxok jelenlétét bizonyító analízis további fontos hozadéka, hogy kiderült (32. ábra): a mérések során azonosított, C box-hoz rendelhető peptidek legtöbbjét nem is az előzőleg azonosított *T. aestivum* adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase (CAC85479) fehérje szekvenciája magyarázza meg, hanem az NCBI dbEST adatbázisban történő lekeresés során meghatározott homológ búzagén transzkriptuma: *T. aestivum* AZO3.101F14R011123 AZO3 *Triticum aestivum* cDNA clone AZO3101F14, mRNA sequence, (NCBI#: [dbEST] gil32557901, LOCUS CD874085). Továbbá, a B-box azonosításakor szekvenált fragmens nem is előbbiek, hanem az *Oryza sativa* germin-like protein 1 (BAA74702) megfelelő régiójával mutatott azonosságot, a minta maradék CID spektrumainak NCBI dbEST adatbázisban történő lekeresése pedig az **AZO3.104J18F010930 AZO3** *Triticum aestivum* cDNA clone AZO3104J18, mRNA sequence [NCBI#: [dbEST] gil32559049 LOCUS CD875233, MW: 23.1 kDa] nyers transzlátumát hozta ki elsődleges találatként.

Az eredmények azt mutatják, hogy a Chinese Spring búzafajtában izolált fehérjé(i)nknek megfelelő *T. aestivum* homológ protein(ek) nem szerepel(nek) az adatbázisban, s csak több homológ fehérje részletes összehasonlításával juthatunk el a kívánt azonosításhoz (32. ábra).

Az, hogy a gélen szeparált három izoformánk közti különbségek aminosav-szekvenciát is érinteneke, egyelőre nem tisztázható. Mindenesetre egy búza germin esetében igazolták, hogy a fehérje SDSgélen eltérő mobilitást mutató két izoformája (G és G') csak N-glükán régiójában tér el egymástól, sőt a két izoforma lehet egyazon gén által kódolt (Berna és Bernier 1997). Bár a GLP-k glükán régióinak mélyanalízise még nem történt meg, egyesek, a denaturáló géleken a legtöbb GLP esetében is tapasztalt, duplikátumos futás miatt azt feltételezik, hogy ebben a családban is általános az olyan izoformák jelenléte, amelyek mindössze oligoszacharid-oldalláncukban térnek el egymástól (Bernier és Berna 2001).

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 Levélrozsda indukálta stresszválasz fehérje- és RNS-szintű analízisének elemzése közel izogén, cv. Thatcher-alapú búzavonalakban

6.1.1 A búza levélrozsda-fertőzésre adott extracelluláris stresszválasz proteomikai értékelése

# 6.1.1.2. Az ICF fehérjemintázatának alkalmassági kérdései (érzékenység, specificitás) a búza levélrozsda-fertőzés ill. rezisztenciaformák felismerésében

A búza – levélrozsda interakcióban általunk vizsgált három közel izogén, 'Thatcher'-alapú búzavonal szekréciós stresszválaszáról eddigi eredményeink alapján összefoglalásként az alábbi megállapításokat tehetjük:

Proteomikai eszközökkel bizonyítottuk, hogy a búza levélrozsda-fertőzésére adott stresszválassszal asszociáltan mind az alkalmazott rasszal szemben fogékony (Tc), mind pedig a két rezisztens (Lr1 és Lr9) búzavonalban számos apoplasztfehérje indukálódott a fertőzést követő egy hét folyamán. E fehérjék között számos PR család képviselőit és különböző izoformákat azonosítottunk.

Egy PR3 típusú kitinázt (BAB82471) mindhárom vizsgált genotípusban, egyes PR1 (CAA07473, AAK60565 ill. AAP14676) és PR2 (endo-1,3-glükanáz) fehérjék (AAY88778 / AAY96422) akkumulálódását pedig mindkét rezisztens genotípusban sikerült tömegspektrometriai úton igazolnunk. Mivel az utóbbi fehérjék a rezisztens vonalakban korábban és nagyobb mennyiségben jelentek meg, levonható az a következtetés, hogy az érzékeny és a vizsgált ellenálló vonalak között a PR proteinek expressziójában is egyértelmű különbségek lépnek fel. A Tc extracelluláris válaszára ugyanakkor jellemzőnek találtunk egy a PR2 fehérjékkel rokon endo-1,3-1,4-glükanázt (ABB96917), bár az általa képviselt glükanáz-kör felgyülemlését stresszválaszok kapcsán kevésbé tartják számon.

A fertőzött Lr9 apoplasztján (5 d.p.i.) átfogó proteomikai analízist végeztünk, melynek során további glükanázokat és kitinázokat, valamint más PR-családok, így a kitinkötő fehérjék, a taumatinszerű proteinek és peroxidázok több képviselőjét azonosítottuk (PR2 - CAA77085, CAI64809, AAD28732, BAE96089; PR3 - AAG53609, AAD28733; PR4 - 2209398A/O64393, AAS78780, O64392; PR5 - AAK55326, AAK55325/AAB71680, CAA66278, AAK60568; PR9 - CAA59486, AAW52716, AAW52720, CAA59485, Q05855) és egy extracelluláris lipáz

(ABL11233) jelenlétét is kimutattuk. Feltételezzük, hogy e fehérjék indukciója a két másik vonal stresszválaszának is részét képezi, bár erre vonatkozó indukciós kinetikai vizsgálatokat nem folytattunk.

A különböző vonalakban végzett vizsgálatok mind arra utalnak, hogy az apoplaszt fehérjemintázatának analízise az adott genotípus stresszválaszának sikerétől függetlenül is érzékeny indikátora lehet a levélrozsda megjelenésének, melyben már az egydimenziós gél-alapú elválasztás is lehetővé teszi a genotípusfüggő változások legalább részleges megjelenítését.

Azonosított fehérjéik lehetséges PR-jellegének és antifungális szerepkörének szakirodalmi bizonyítékait a M1.1 számú mellékletben foglaltuk össze.

## 6.1.2 A búza levélrozsda-fertőzésre adott stresszválaszának apoplaszt endo-1,3-glükanáz és kitináz aktivitás alapú értékelése

Teljes apoplasztkivonaton végzett, extracelluláris aktivitás-assayek révén igazoltuk, hogy a szekretált 1,3- $\beta$ -D-glükanázok és kitinázok mindhárom vizsgált vonalban induktív jelleggel, de genotípustól függő módon vesznek részt a védekezésben. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a fogékony és a rezisztens vonalak eltérő válasza – a vizsgált két szekretált enzimcsoport szintjén – főként nem az indukció kinetikájában, hanem leginkább a maximálisan indukált enzimek eltérő mennyiségében rejlik. Ezt támasztja alá, hogy, bár a fertőzést követő pár órában a fogékony Tc-ben korábbi (10-12 h.p.i.) indukciót detektáltunk, az Lr1 ill. Lr9 rezisztenciagént hordozó 'Thatcher' alapú búzavonalak intercelluláris folyadékában a fertőzést követően idővel (2-3 d.p.i) szignifikánsan nagyobb mennyiségben jelentek meg, majd (4 d.p.i. $\rightarrow$ ) tartósan magas aktivitás-szinten maradtak az általunk vizsgált apoplasztikus 1,3- $\beta$ -D-glükanázok és kitinázok. Ez, fogékony és rezisztens gazdanövényekben való indukálhatóságuk bizonyítása mellett sikeres védekezésben való közreműködésüket is valószínűsíti.

Aktivitásvizsgálataink eredményei egyrészt a három genotípusban indukálódott extracelluláris 1,3glükanázok és kitinázok eltérő szabályzására utalhatnak. Ugyanakkor, a két enzimosztály proteomikailag azonosított képviselőinek megfelelő gélsávok intenzitásai és az aktivitásgörbék lefutása között feltételezett átfedések tökéletlenségei azt is valószínűsítik, hogy az eddigiekben MSazonosított proteinek mellett más izoformák, osztályok, esetleg azonos funkciójú fehérjecsaládok is közreműködhetnek a kompatibilis és inkompatibilis stresszálaszokban, és akár az Lr1 és az Lr9 vonalak között is jelentkezhetnek különbségek.

## 6.1.3 A búza levélrozsda fertőzésre adott stresszválaszának értékelése endo-1,3-glükanáz és kitináz izoformák transzkripciós vizsgálatán keresztül

A levélrozsdafertőzéssel asszociáltan azonosított illetve feltételezett apoplasztikus glükanáz és kitináz izoformák indukciójának megerősítésére génexpressziós vizsgálatokat is végeztünk a Tc és az Lr9 vonalban. A hagyományos RT-PCR-ben egyrészt egy-egy, proteomikai úton már azonosított fehérje indukciójának transzkripciós igazolását tűztük ki célul, melynek érdekében elsősorban az MS-azonosításuk alapjaként szolgáló triptikus peptidekből levezetett primerekkel dolgoztunk. Annak érdekében, hogy egyidejűleg fellépő különböző izoformák együttes hatását felmérhessük, azok párhuzamos amplifikálását lehetővé tevő, tágabb rokonsági körökre ill. glükanáz és kitináz ágakra specifikus indítószekvenciákat is alkalmaztunk.

A különféle primerpárokkal kapott cDNS-klónok szekvenálása az alábbi eredményekre vezetett:

### A.) 1,3-GLÜKANÁZOK esetén:

A proteomikai eredményeket alátámasztva két jellegzetes endo-1,3-glükanáz ág képviselőinek expresszióját sikerült igazolnunk fertőzött Lr9 vonalban (19. ábra):

- A TaeGlu3 primerpárral fertőzött Lr9 minta (3 d.p.i.) cDNS-ét amplifikálva megerősítettük annak az endo-1,3-glükanáz ágnak az expresszióját, amelynek indukálódását korábban proteomikai úton mindkét rezisztens genotípusban (Lr1 és Lr9) igazoltuk két ill. három képviselővel (CAA77085 és AAY88778/AAY96422). Két szekvenált klónunk az illeszthető szakaszon mindössze 2-2, ill. 3 és 4 nukleotidban tér el az MS-alapon feltételezett és keresett Y18212 ill. DQ090946/DQ078255 transzkriptumoktól. A klónok nyers transzlátumai fehérjetermékek szintjén már nem különböznek, az előbbi transzkriptumoknak megfeleltethető, várt glükanáz fehérjékhez képest pedig mindössze 1 illetve 2 aminosavnyi (26.: Ser vs. Ala, továbbá 29.: Thr vs. Met) eltérést mutatnak.
- A TaeGluF5-R4 primerpár alkalmazásával nyert, fertőzött (7 d.p.i.) Lr9-ből származó egyegy klónunk egy másik endo-1,3-glükanáz ág képviselőinek expresszióját bizonyította, mégpedig a PR2-jellegű *TaGlb2b* és *TaGlb2f* génét (AB244638.2 - Δ: 0 nt; AB244642 - Δ: 1 nt). Az amplifikált transzkriptumok génjeivel jelenleg leginkább rokonítható *TaGlb2a* gén épp azt a fehérjét (BAE96089) kódolja, amelynek jelenlétét az Lr9 fertőzött mintájában (5 d.p.i) korábban MS-alapon már igazoltuk.

### B.) KITINÁZOK esetén:

- A TaeChi4, kitinázokra általánosan tervezett primerpár révén megbízhatóan amplifikáltuk a korábban proteomikailag mindhárom genotípusban (3 ill. 5 d.p.i.) igazolt kitináz 1 (BAB82471), és a fertőzött Lr9 vonalban (5 d.p.i.) előbbivel együtt kimutatott chitinase IV precursor (AAD28733) fehérjék transzkriptumainak, a *Chi1*-nek (AB029934) ill. a *Chi IV*nek (AF112966) megfelelő régióit. Mivel utóbbit a Tc kontrollból amplifikáltuk, nyilvánvaló, hogy a *Chi IV* nemcsak fertőzés hatására és a rezisztenciával asszociáltan expresszálódik.
- 2. A keresett *Chi1* génnel közeli illetve távolabbi rokonságban álló, de adatbázisokban jelenleg komplett formában nem szereplő gének expressziójára következtetünk továbbá az univerzálisabb TaeChi4-gyel nyert egyéb cDNS-ek és a specifikusan *Chi1*-re tervezett két kitináz primerpár (TaeChi3 és TaeChi2) által amplifikált PCR termékek szekvenciájából (21-22. ábra):
  - a. a TA53878\_4565 jelű kontig (TIGR dbEST) megfelelő régiójával 100 %-os azonosságot mutató klónokat azonosítottunk a Tc vonalból (3 d.p.i. és kontroll), valamint a TA53666\_4565 kontigra 98-100 %-ban illeszkedő, s az előbbivel szinoním szubsztitúcióikat viselő klónokat fertőzött mintákból (Tc és Lr9; TaeChi3 primerpár). A megfelelő transzlátumok egy-egy aminosavban különböztek a keresett *Chi1*, és az azzal leginkább rokonítható egyéb, kitináz 2 osztályba sorolt gének termékeitől.
  - b. egy, a CV762827 klónra (TIGR dbEST) 100 %-ban illeszthető szekvenciát klónoztunk kontroll Lr9 és fertőzött Tc (4 d.p.i.) mintákból (TaeChi4 primerpár), amely *Chi1*-hez képesti egyik legjellemzőbb eltérése, hogy Stop-kodont hordoz a szekvencia középső régiójában.
  - c. a TA97587\_4565 jelű kontigra (TIGR dbEST) 1 nukleotid-eltéréssel illeszthető klón alapján egy meglehetősen egyedi transzkriptum indukcióját feltételezzük a fertőzött Lr9 (3 d.p.i.) mintában (TaeChi2 primerpár), amely a jelenleg ismert kitináz-szekvenciáktól, így a *Chi1*-től is több régióban következetes eltéréseket, többek közt egy jellemző, 5 aminosavnyi hyatus-t és a nevezett régióban prolint is hordoz. A megfelelő terméket egyáltalán nem amplifikáltunk a fertőzött Tc ill. a kontroll mintákból.

A specifikusabb amplifikációt lehetővé tevő glükanáz és kitináz primerpárokkal végzett szemikvantitatív PCR-vizsgálatok eddigi eredményei arra utalnak, hogy a TaeGlu3, a TaeGluF5-R4 és a TaeChi3 primerpárral amplifikálható géncsoportok a fertőzés hatására kezdetben  $(0\rightarrow 1 \text{ d.p.i.})$ egyaránt intenzíven expresszálódnak a Tc és az Lr9 vonalban, később  $(1\rightarrow 3 \text{ d.p.i.})$  azonban a rezisztens vonalban erőteljesebb az expresszió. A TaeChi2 primerpárral egyelőre csak Lr9-ben (3 d.p.i.) amplifikált PCR-termék alapján feltételezett, Lr9-specifikus indukció további megerősítését célzó kísérletek folyamatban vannak.

Génexpressziós analíziseink tehát összességében egyrészt megerősítik proteomikai eredményeinket, igazolva, hogy egyidejűleg egyazon fehérjecsalád többféle izoformája is kifejeződik a levélrozsdafertőzés kapcsán indukálódó stresszválaszban. Másrészt néhány további, eddig nem ismert génvariánst is azonosítanak, amelyek tényleges előfordulására kísérleteinktől független megerősítést szolgáltat az adatbázisokban leírt, fehérje vagy nukleinsav (teljes transzkriptum ill. klón vagy kontig) alapon azonosított búzahomológok szekvenciája.

Az egyes glükanáz vagy kitináz izoformák proteomikai vagy transzkriptum alapon feltételezett indukciójának megerősítését kvantitatív, valós idejű RT-qPCR-rel látjuk megvalósíthatónak, amennyiben (a számos, továbbra is ismeretlen homológ interferáló hatását kiküszöbölve) az azonosított transzkriptumok kellően specifikus amplifikációját biztosítani tudjuk a jövőben. A valós idejű PCR-vizsgálatoknál szintén jövőbeni megoldásra vár egy valóban stabil kifejeződést mutató referenciagén fellelése, mert az ubiquitin a mi rendszerünkben erre nem tűnik alkalmasnak. Az újabb jelöltek tesztelése (pl. 18S rRNS, GAPDH) jelenleg is folyamatban van. A qPCR-rel egyúttal az is tesztelhető volna, hogy fennállnak-e az egyes genotípusok közt egy-egy izoforma tekintetében szabályozási eltérések, amelyek az expressziós időkinetikában vagy az intenzitásban akár az enzimaktivitás görbéinek eltérő lefutásáért is felelőssé tehetőek.

A genotípus-függő génexpressziós eltérések hátterének feltárásában kiemelkedő jelentőségű lehet az azonosított izoformák szabályzórégióinak vizsgálata, ezt azonban a komoly genomi adatbázishiányosságok búzában egyelőre nem teszik lehetővé. Az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében génjeink megfelelő ortológjainak felhasználásával a rokon rizsben (*O. sativa* ssp. *japonica*) Cserháti Mátyás végzett promóter-analízist a kérdés tisztázására. Ezek az eredményei bár iránymutatóak, mindenképpen fenntartásokkal kezelendők, és nem helyettesíthetik a búzában feltételezhető, homeológ genomok egymásrahatásából létrejött, jóval összetettebb szabályozási háttér jövőbeni, konkrét vizsgálatát.

## 6.2 A kadmium-kezelt árpa extracelluláris proteomikai analízisének értékelése

A kadmium-kezelt árpa intercelluláris folyadékának proteomikai vizsgálatát általánosan értékelve az alábbi, összefoglaló jellegű megállapításokat tehetjük:

# 6.2.1 Módszertani értékelés az egy- és kétdimenziós elválasztás, valamint a kétféle MS-technológia összevethetőségéről

A kadmium-kezelés 4. napján kivont apoplasztfehérjék összehasonlító proteomikai analízisénél az egy- és kétdimenziós elválasztás összevethetőségéről általánosságban elmondható, hogy - a várakozásoknak megfelelően - az 1D-gélek alapján érdekesnek ítélt molekulatömeg-tartományokban 2D-szeparáció után is különbségeket figyeltünk meg. A 2D-gélek nagyobb mintafelviteli kapacitása és a jobb elválasztás ugyanakkor lehetővé további eltérések azonosítását is. Az elválasztott fehérjék izoelektromos pontja azt mutatja, hogy az általunk izolált intercelluláris folyadékban mind savas, mind pedig bázikusabb jellegű fehérjék képviseltetik magukat (36. és 29. ábra).

Az MS-azonosított fehérjék közt az elválaszthatóság alapján több kategória volt felállítható:

- a.) Azonosítottunk olyan fehérjéket, amelyek kimutatására mindkét szeparációs technológia elégségesnek mutatkozott, bár a 2D-PAGE jobb elválasztásának köszönhetően az MS-analízise ott nagyobb lefedettséget, így pontosabb azonosítást tett lehetővé. Ilyen pl. a feltételezetten PR2 családba sorolható, legalább két endo-1,3-glükanáz alkotta csoport (1D: [01] sáv, 2D: [Wc] folt). Ide sorolható továbbá egy savas kitináz (PR3) enzim azonosítása ([02] sáv; [Bc] folt), valamint a BSP csoportba tartozó és PR17 fehérjékkel rokon, ismeretlen szerepű fehérje (hypothetical protein) detektálása ([02] sáv, [Xc] folt).
- b.) Egy további csoportot alkotnak azok a fehérjék, amelyek jelenlétét (és expressziójuk feltételezett megváltozását) csak az 1D vagy csak a 2D-foltok analízise nyomán sikerült bizonyítani. Csak 2D-analízis után detektáltuk a bázikus kitinázt ([Zc] folt), továbbá a taumatinszerű fehérjék (PR5 család) több tagját [Xc, Yc foltok]. Említésre érdemes viszont, hogy csak az 1D-analízis jelezte pl. a BSP rokon PR17c prekurzorának konkrét jelenlétét ([02] sáv). Még fontosabbnak tekinthető a kitin-kötő vagy kitináz aktivitású PR4 fehérjék több tagjának (pathogenesis-related protein 4 és Barwin) az egydimenziós [03] sáv alapján feltételezett szerepvállalása a kadmium stresszben. Ez felhívja a figyelmet további 2D foltok azonosításának szükségességére.

- c.) Egy külön csoportba sorolhatók azok a homológ fehérjék, amelyek egymással közel rokon, de egyértelműen eltérő izoformáit határozta meg az MS-analízis az egy- és a kétdimenziós foltokban. Példaként említhető a PR1 családba tartozó PRB1-3 prekurzor (syn. PR-1B / HV-8; [02] sáv) ill. homológja, a PR-1a (pathogenesis related protein Hv-1a; [Qc] folt), ahol az 1D-sáv egy peptid alapján egyértelműen a PRB1-3, míg a 2D-folt 9 eltérő pozícióval a PR-1a jelenlétét igazolta. Jelenleg azt feltételezzük, hogy mindkét fehérje jelen van és indukálódik kadmium hatására, főként, hogy az érett formák kalkulált tömegének és töltésének megfelelő régióban, a Qc folt közvetlen közelében több fehérje vár még az azonosításra.
- d.) A kloroplasztisz eredetű RuBisCO fehérje fragmentumainak kis molekulatömegtartományban való azonosítása (~12-13; 17 kDa) külön tárgyalást érdemel. A legvalószínűbben szennyeződésként megjelenő fehérjét többnyire a kadmium-kezeléssel összefüggésben, csökkenő intenzitású foltként detektáltuk (vö. [10] sáv és [C] folt, *de* Qc folt), s jellemzően jóval kisebb lefedettséggel, mint a relevánsnak tűnő apoplasztfehérjéket. A kis és körülhatárolható régiókat érintő lefedettség talán az enzim kadmium hatására megváltozó fragmentálódásának tudható be.

A kétféle tömegspektrometriai rendszer (MALDI-TOF és LC-MS/MS) egymást kiegészítő, szinergista felhasználásáról az eredmények közt (pl. az endo-1,3-glükanázok azonosíthatósága kapcsán) már említést tettünk, de a szekvencia-információt egyértelműsítő tandem technológiák egyértelmű pozitívumain túl az eltérő ionizációs ill. detektálási módok párhuzamos alkalmazása további előnyökkel is járhat. Bár a MALDI-TOF révén általában nagyobb lefedettségeket kaptunk, legtöbbször az LC-MS/MS maga is szolgáltatott információt olyan szekvenciarégiókról, amelyek MALDI-TOF technológiával nem voltak detektálhatók.

## 6.2.2 Funkcionális értékelés az azonosított fehérjék kadmium-stresszben feltételezett szerepeiről

A kadmium-stressz kapcsán indukált és kísérleteinkben azonosított apoplaszt proteinek kadmiumstresszben feltételezett relevanciájáról eredményeink és a szakirodalom tükrében az alábbi álláspontot képviseljük:

Az érintett fehérjecsaládok egyrészében az eddig leírt funkciók alapján (PR5, azaz taumatinszerű fehérjék) vagy a funkciókról való ismeretek szinte teljes hiányában (PR1 és PR17) feltételezhető,

hogy valóban célzott, pl. méregtelenítő szerepkörben funkcionálhatnak a nehézfémekre adott stresszválasz kapcsán. A közismerten antifungális PR3 és PR4, kitináz ill. kitinkötő aktivitású fehérjecsaládok esetében ez a lehetőség már erőltetettnek tűnik, bár köztük is ismertek egyszerre több funkciót betöltő, pl. fagyás elleni védelemre evolválódott proteinek. A különböző specificitású és glükanáz aktivitású fehérjékről általánosságban még több ismeret áll rendelkezésre, így a kép még összetettebb: Már az 1,3- ill. 1,6-glikozidos kötések hasítására specializálódott 1,3-glükanázokról is közismert, hogy nemcsak antifungális funkciót tölthetnek be (a PR2 fehérjecsalád tagjaiként), de számos normál vegetatív és szaporodásbiológiai folyamatban is közreműködhetnek (Leubner-Metzger és Meins 1999). Mivel pedig a hormonok glikozidjainak széles köre is a glükanázok potenciális szubsztrátjai közé tartozik, biotikus és abiotikus(!) stresszekhez kapcsolt *jelátviteli* folyamatokban való közreműködésük szélesebb körű lehet, mint ahogyan azt exo- vagy endogén elicitorképző sajátosságuk kapcsán, első közelítésben gondolhatnánk.

Mindezek ellenére, a kísérleteink során azonosított fehérjék fokozott expressziója hátterében valószínűleg inkább indirekt mechanizmusok állnak, s indukálódásuk egy kadmium által kiváltott, szélesebb és általánosabb jellegű (oxidatív) stresszválasz következménye lehet. Ekkor a szekretált fehérjék antioxidánsként vagy más módon, akár egy esetleges patogéntámadásban is hasznosulhatnak – a keresztrezisztencia jelenségének, ill. a sörétes lövedék alkalmazási elvének és szóródási képének megfelelően.

Azonosított fehérjéik lehetséges PR-jellegének és nehézfémstresszben betöltött szerepének részletes taglalását, a szakirodalmi bizonyítékokkal az M1.2 számú mellékletben foglaltuk össze.

# 6.2.3 A kadmium és a levélrozsda elleni védekezésben egyaránt érintett PR családok indukciós mehanizmusának hátteréről és jelentőségéről

A nehézfémstresszek kapcsán aktiválódó szignáltranszdukciós útvonalak térképezése során egyre több jel utal arra, hogy például a jazmonsav- ill. etilén-útvonal is érintett lehet az indukálódó stresszválasz egyes részletei révén (Maksymiec 2007). Előbbiek mellett, a legtöbbször hiperszenzitív reakcióval asszociálódó SA-útvonallal pedig a generált reaktív oxigéngyököknek köszönhetően találunk a jelátvitel szintjén kapcsolódási pontokat (33. ábra).

A szalicilsav nehézfémstresszben betöltött szerepe ugyanakkor részleteiben egyelőre még nem tisztázott, bár Cd-kezelt növényekben a stresszválasz részeként jól ismert tünet a SA-felgyülemlése. Metwally és mtsai (2003) kadmiummal kezelt árpanövényeken SA-előkezelést is alkalmazva a kontroll mérgezettekhez képest mérsékelt oxidatív stresszállapotot mutató és a fotoszintézis

hatékonyságában és a szöveti gyarapodásban is kisebb mérvű csökkenéssel jellemezhető egyedeket találtak. Ezekben az exogén szalicilsav hatására megjelenő fokozott tolerancia nem a redoxhomeosztázisban résztvevő antioxidáns enzimek fokozott indukcióján keresztül érvényesült, ráadásul a vakoluáris Cd<sup>2+</sup> mennyisége sem mutatott növekedést. A protektív hatást magyarázhatja pl. a sejtnedvi szabad Cd<sup>2+</sup> felgyülemlését meggátló metabolitok, így fitokelatinok és metallotioneinek, sőt SA, termelődésének fokozása, egyes (pl. ABC) transzporterek indukciója révén pedig a fémion szervek közti ill. plazmamembránon keresztüli transzportfolyamatainak eltolódása és egyes javítómechanizmusok támogatása.



33. ábra: A biotikus stressz és a fémion-toxicitás kölcsönhatásai a jelátvitel szintjén.

(a) A nehézfém- és biotróf patogén-stressz kapcsán aktiválódó, részben átfedő jelátviteli útvonalak, mint a növényvédelmi célú fémkezelés molekuláris háttérfeltételei.

A SA-túltermelő, így biotróf patogéntámadásra SA-indukciót nem mutató növények védekezése nehézfémhiperakkumulációval javítható. PC: fitokelatin; GR: glutation-reduktáz; GSH: redukált glutation; PC: fitokelatin(ok); SAT: szerin-acetiltranszferáz

(b) A növény patogén-ellenállóságának fokozása a nehézfém-stressz hatására is felgyülemlő reaktív oxigénformák (ROS) révén.

A nehézfém-ion közvetlenül is, de a növényben másodlagosan okozott, az oxidatív stressz kapcsán megjelenő reaktív oxigénformák és az általuk kiváltott reakciók által egyaránt gátolhatja a kórokozót ill. kártevőt. A sejtfalszerkezet mechanikai erősítése mellett a ROS szignálként is képes aktiválni ill. stimulálni a szalicilsav (SA)-útvonalat, amely idővel, antioxidánsok akkumulációja, ill. stresszfehérjék indukciója révén több vonalon is képes közreműködni a gazdanövény védelmében. (*Forrás:* Poschenrieder *et al.* 2006)

A nehézfém-stresszek (Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) kapcsán aktiválódó MAP-kináz útvonalak létéről csak az utóbbi évtizedben számoltak be Jonak és mtsai (2004), de már néhány évvel korábban is születtek publikációk számos fém- ill. metalloid-ion patogén gombák, vírusok és rágó- ill szívókártevők

elleni rezisztenciára gyakorolt pozitív hatásáról (Poschenrieder *et al.* 2006) és ennek jelátviteli vonatkozásairól. Kadmium-kezeléssel összefüggésben, különösen a kórosan magas SA-tartalmú, patogén-szignálra érzéketlenebb hiperakkumulátor növényeknél, többek közt, pl. *Thlaspi* fajokban, továbbá dohány és búza esetében is ismertek beszámolók (Jiang *et al.* 2005, Ghoshroy *et al.* 1998, Mittra *et al.* 2004).



**34. ábra:** A biotikus stressz és a fémion-toxicitás kölcsönhatásai az anyagcsere szintjén. A kétféle stresszor stresszválaszához kötődő, részben átfedő növényi génexpressziós változások mind a sikimisav-útvonalban, mind pedig a kén-anyagcserében a biotikus stressz elleni védelemre és a toxikus fém eliminálására (pl. fémkötésre) is hatékony komponensek megjelenéséhez vezetnek. A felgyülemlő antioxidánsok (pl. redukált glutation) a másodlagosan mindkét esetben kialakuló oxidatív stressz csökkentésében és az ellenállóképesség kialakításában is közreműködhetnek. A közvetlenebb hatások mellett, a sikimisav-útvonalban szintetizálódó auxin a stressz metabolizmus és az adaptív növekedés közti kapcsolatot képes biztosítani: az auxin-indukált oldalgyökérképzés a gyökér kevésbé szennyezett talajrégiókba való kiterjedését teszi lehetővé, mint ahogyan a tőhajtás megújulása az asszimmilátumok gyors regenerációja révén szintén a kompenzáció lehetőségét vetíti előre. (*Forrás:* Poschenrieder *et al.* 2006)

Mivel a fémkezelt egyedek az anyagcsere számos pontján érvényesülő, s akár adaptív előnyökre is szert tehetnek más kórfolyamatokban is aktiválódó, részben átfedő jelátviteli hálózataik stimulálódásának köszönhetően (34. ábra), egyes kutatókban költségoptimalizálási céllal az is felmerült, hogy bizonyos biotróf patogén populációk ill. más kártevők visszaszorításának céljából helyi szinten nehézfém-hiperakkumuláló növényállományokat lehetne fenntartani, illetve szántóföldi körülmények között a fogyasztást még nem zavaró koncentrációkban alkalmazva (pl. fumigálásként vagy felszívódó formában műtrágyához keverve) a nehézfémeket, a védekezési folyamatok szisztemizálódást is biztosító előkezelésként volna stimulálható a növények feltételezett patogének elleni védekezése (Poschenrieder *et al.* 2006).

Jelenlegi tudásszintünknél azonban, még bármiféle humán-egészségügyi, gazdasági vagy ökológiai érdekre való tekintet nélkül, kizárólag a növényegyed szempontjából sem érezzük ezt a bátor közelítést kellően biztonságosnak, hiszen úgy tűnik, a nehézfémek által beindított és egymással sokszoros csatolásban álló jelátviteli útvonalak egyrésze (pl. a jazmonátok és az etilén indukció révén) hosszabb távon kifejezetten kedvezőtlenül is befolyásolhatják az egyed túlélését (Iakimova *et al.* 2006, Maksymiec 2007).

## 6.3 A Chinese Spring referencia-apoplaszt térképezés jelenlegi fázisának értékelése

## 6.3.1 A búza apoplaszt referencia-fehérje térképezés módszertani és bioinformatikai korlátai

#### Nehézségeink az azonosítás terén

A búza apoplaszt referencia-fehérjetérképezése során számos akadályba ütköztünk, melyek jelentős része az adatbázis-hiányosságokból fakadt. Bár a 'Chinese Spring' fajta genomi térképezése gőzerővel folyik, a már publikált szekvenciák esetében sem teljes az annotáció, s gyakran csak cDNS-klóntárakból, EST- illetve TA-adatbázisokból lehetett a megfelelő fehérje vagy közeli homológja lehetséges jelenlétére, kifejeződésére (nagyon ritkán funkciójára) következtetni. Ilyenkor a legközelebbi homológként más fajokban azonosított, már annotált szekvenciák segíthetnek, amire jó példa a [C1] foltban azonosított beta-D-galactosidase esete. Máskor azonban, mint pl. a [Q1] foltban, a beta-D-xylosidase (*Oryza*) mellett független szekvenciaként, 11 % lefedettséggel azonosított búza cDNS-klón: *Triticum aestivum* FGAS082059 Triticum aestivum FGAS: Library 5 GATE 7 Triticum aestivum cDNA, mRNA sequence (NCBI# [dbEST]: gil70963493, LOCUS: DR736689, MW 38,7 kDa), továbbá a [D1] foltban 15 %-kal azonosított *Triticum aestivum* cDNA, mRNA sequence (NCBI# 1 Triticum aestivum cDNA, mRNA sequence (NCBI# [dbEST]: 39618159, LOCUS: CK212055, MW 38,6 kDa) esetében a transzlátumok egyelőre teljesen ismeretlen szerepűek, mint ahogyan homológjaikat sem találjuk.

Az azonosítás másik problémája, hogy az azonosított és funkcionálisan is jellemzett fehérjék közt jelentős számban találhatóak vélt vagy valós intracelluláris szennyezők. Az apoplasztkutatás egyik legnagyobb nehézségének a fotoszintézis Calvin-ciklusának CO<sub>2</sub> fixáló enzime, a RuBisCO fragmentjeinek elkerülhetetlen jelenléte tekinthető, amely az élővilág legabundánsabb fehérjéje, s a fotoszintetizáló szövetekben a sejtek fehérjeállományának közel 30-50 %-át teszi ki (Ellis 1979). Az elemi anyagcsere-folyamatokban közreműködő enzimek közül hasonló, kloroplasztisz eredetű szennyezőkként tapasztaltuk már a szedoheptulóz-1,7-biszfoszfatáz és a foszfo-ribulokináz, illetve citoplazmás forrásból a szénhidrát lebontásban közreműködő glikolízis egy elemének (fruktóz-1,6-biszfoszfát aldoláz) valamint egy (nem peroxiszómális!) kataláz-1 fehérjének megjelenését is.

Az intercelluláris fehérjék megjelenéséért leggyakrabban az intercelluláris folyadék kinyerésének körülményei tehetőek felelőssé. A probléma elkerülése érdekében számos különféle (invazív és kevésbé invazív) eljárás, fajra illetve sejt- és szövettípusra specifikált protokoll létezik a szakirodalomban (Watson és Sumner 2007). A Rubisco utólagos eltávolítására is van lehetőség, pl. szelektív kicsapások vagy affinitás-oszlop alkalmazásával (Kim *et al.* 2001, Hashimoto és Komatsu 2007), ez azonban még viszonylag új területnek számít, és pl. teljes kivonatok érzékenyítő analízisénél jelentős kockázatot is hordozhat.

Az apoplasztfehérjék kinyerési technikái közt az általunk is alkalmazott vákuum-infiltrációs technika általánosan elfogadott (Lohaus *et al.* 2001). A standard ellenőrzésre használt, intracelluláris marker enzimek aktivitás assay-ei (pl. citoplazmás MDH, HPI, a plasztiszban/sejtnedvben lokalizált G6PDH) alapján csak meghatározott puffer-ionerő illetve legtöbbször >600(-1000) xg centrifugális erő felett tapasztalható érdemi sejtnedvi folyás (Rohringer *et al.* 1983, Lohaus *et al.* 2001), amit a jobb érzékenységet biztosító immunológiai kimutatások is megerősítenek (Alves *et al.* 2006).

Újabb kutatások alapján azt valószínűsítik, hogy a potenciális sejtnedvi szennyezők egy jelentős része nem feltétlenül valódi kontamináció. Különböző fajok gyökér exudátumainak vizsgálatakor, gyökérsüvegsejt-szuszpenziók felülúszójának analízisénél Wen és mtsai (2007, 2008) azt tapasztalták, hogy az azonosított fehérjék közt jelentős számban találhatóak a korábbi szakirodalmi adatok szerint egyértelműen sejtnedvi vagy organelláris származékként elkönyvelt proteinek (pl. aktin, riboszómális és hősokk-fehérjék, fruktóz-biszfoszfatáz, enoláz, 14-3-3 protein stb.). Utóbbi extracelluláris lokalizációját immuncitokémiai vizsgálattal is igazolták (Wen 2007). Különösen az exudátum kivételesen finom kivonási módja vet fel erőteljes kétségeket a korábban feltételezett lokalizációk kizárólagosságát illetően. A szekréció környezeti hatásokra esetleg megváltozó jellege ebben a vonatkozásban különösen megfontolandó.

Az egyes találatok aktuális relevanciáját, az egyedi döntéseket az is nehezíti, hogy gyakran csak transzkriptum-adatok állnak rendelkezésünkre, és az RNS-ek érése és a fehérjék szintjén végbemenő módosítások miatt méginkább nő a bizonytalanság – így az EST adatbázisok, jelenlegi tudásunk szintjén nem elengendőek a lokalizáció kérdésének megválaszolásához. Végül, általános

bizonytalansági tényező, hogy a szekvencia-lefedettség sohasem teljes, még akkor sem, ha a keresett fehérje szerepel az adatbázisban. A töredék százalékok hátterében emiatt nemcsak egyes, nem jól ionozálódott/repülő/detektálható peptidek állhatnak, hanem az adott szekvenciának megfelelő peptid hiánya is az adatbázisban, különösen nem feltárt genomú fajok esetében. Így, mégha teljes aminosav-szekvenálást is végeznénk, megvan az esélye, hogy keresett fehérjénk még nem szerepel vagy nem annotált az adatbázisban, s homológia alapján helyette olyan rokon izoformát azonosítunk, amelynek szekréciója nem feltétlenül esik egybe tényleges fehérjénkével.

## 6.3.2 Az eddigiekben azonosított referencia apoplasztfehérjék lehetséges szerepkörei

Megkezdtük a 'Chinese Spring' búzafajta egészséges, kifejlett első leveles csíranövényének apoplasztján egy kétdimenziós gél-alapú referencia fehérjetérkép megalkotását, melynek során tömegspektrometriai úton (MALDI-TOF ill. LC-MS/MS révén) eddig az MS-analizált foltok (21) közül 11 foltban [B1, B3, C1, Ex, F1, F5, G1, G2, G4, P2, Q1] találtunk az apoplaszt szempontjából egyértelműen releváns, összesen 9 proteint, az NCBInr fehérje- illetve az adatbázis hiányosságai esetén a db[EST]-adatbázis felhasználásával.

Nagyobb megbízhatósággal (>10 %-os lefedettség mellett) egyelőre hét apoplasztfehérjét azonosítottunk búzában vagy megfelelő gabonafélékből (*g. Hordeum, Oryza, Coix*) izolált homológjaiban:

Három izolált protein esetében megfelelő búzafehérjét is találtunk az adatbázisban, egy multifunkciós **ADP-glükóz pirofoszforilázt** [G1, G2, G4 folt], valamint két glükanáz aktivitású proteint, egy (**1,3;1,4**)-**béta-glükanázt** [F5 folt] és egy putatív **endo-1,3-béta-D-glükozidázt** [P2 folt]. Ezek csírázást és a fejlődő vegetatív szövetek osztódását és differenciálódását elősegítő szerepkörük mellett egyes patogének ellen, a preformált védekezés tagjaiként szintén közreműködhetnek. Az elsőként említett, s a vizsgált fejlődési stádium apoplasztjában dominánsnak tűnő ADP-glükóz pirofoszforilázról további analízisekkel, két konzervatív box (B és C), valamint egy jellemző, sejtadhézióban szerepet játszó KGD motívum igazolásával azt is bizonyítottuk, hogy az azonosított fehérje a germinszerű proteinek körében sorolható s így potenciálisan a PR16 család képviselője.

Kielégítő lefedettséggel igazoltuk továbbá négy olyan, nagyobb (>40 kDa) molekulatömegű apoplasztikus fehérje jelenlétét, amelyek szekvenált peptidjei az NCBInr adatbázisban egyelőre más gabonafélék homológ fehérjéire illeszkednek leginkább. Ide tartozik egy **arabinoxilán-arabinofuranohidroláz izoenzim (AXAH-II)** és egy bifunkciós **alfa-L-arabinofuranozidáz** / **béta-D-xilozidáz izoenzim (ARA I)**, melyeket eredetileg árpában írtak le [B1, B3 folt], egy rizs

béta-D-xilozidáz [Q1], valamint egy számos faj béta-D-galaktozidázainak [C1] egyaránt megfeleltethető protein. A felsorolt négy, enzimaktivitással is jellemezhető fehérje a növényi sejtfal-poliszacharidok lebontását és átalakítását végzi, s így szinergista módon járul hozzá a növekvő és differenciálódó sejtek fejlődéséhez, de egyes formáik endogén elicitorképző hatásáról is születtek már beszámolók.

Emellett, kisebb megbízhatósággal - három illetve egy jellemző peptid révén - azonosítottunk egy vad gabonafélében leírt, egyedi kettős aktivitású **alfa-amiláz inhibítor / endokitináz**t [Ex folt], amely rovar eredetű herbivorok és gombapatogének ellen egyaránt védelmet nyújthat, valamint egy egy árpában leírt, s a BSP családba ("bázikus szekretált proteinek" közé) sorolt **"hipotetikus proteint**" [F1 folt], amelynek szerepét a PR17 családba tartozó szekvenciális homológjai miatt patogenezissel összefüggésben valószínűsítik.

Utóbbi két fehérje azonosítása az alacsony lefedettség, ill. az adatbázis hiányosságok miatt még módosulhat, így nem tekinthető véglegesen lezártnak. Kérdéses azon peptidek eredete is, amelyek ugyan rendelkeznek szekvenciájukból levezethető cDNS-klónokkal az EST-adatbázisban, de megfelelő vagy rokon, annotált fehérje homológjaik adatbázisokban egyelőre nem hozzáférhetőek.

A referenciatérkép további fehérjékkel való kiegészítése – a fehérjemintázatból is egyértelműen igazolható, legalább pár százas fehérjesokféleségnek köszönhetően és az adatbázishiányosságok ellenére - jelenleg is zajlik, valamint egy mestergél előállítása és statisztikai kiértékelése 6 független izolátumból származó 14 mintázat analízise révén szintén folyamatban van.

Végül pedig, az ismert vagy egyelőre csak feltételezett apoplasztfehérjék sikeres azonosításához a közeljövőben az is hozzájárulhat, hogy szelektív izolálásuk és *in situ* lokalizációjuk érdekében munkacsoportunkban előállítottak több, búza apoplaszt proteineket felismerő monoklonális ellenanyagot. Reményeink szerint ez a többirányú közelítés hozzá fog segíteni ahhoz, hogy hatékonyabbá tegyük az apoplasztban zajló összetett anyagcserefolyamatok felderítését.

### 6.4 Kitekintés

Doktori munkám során a növény fehérjemintázatában kifejeződő stresszválasszal foglalkoztam két, világszerte gazdasági jelentőséggel bíró gabonanövényen, búzában illetve árpán. Vizsgálataimat fejlődési szempontból a csíranövény állapotra, helyileg a levél apoplasztjában megjelenő változásokra szűkítettem le.

Eddigi eredményeink és tapasztalataink fényében, a jövőre tekintettel a következő feladatokat tartom fontosnak illetve látom megvalósíthatónak a disszertációmban tárgyalt három területen:

A. A levélrozsda-rezisztencia kutatása során elemzett Thatcher-alapú búzavonalakban vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük: az apoplaszt, mint speciális közeg alkalmas-e arra, hogy abban - közel izogén, de a stresszválasz eredményessége szempontjából merőben eltérő genotípusokat elemezve - olyan szekretált fehérje-markereket azonosítsunk, amelyek a különböző rezisztenciatípusokkal asszociálhatóak.

Már az apoplaszt proteomikai elemzése során is számottevő és némely esetben genotípustól is függő sokféleséggel szembesültünk az indukálódó PR-, azaz patogenezis kapcsán indukálódó fehérjecsaládok tekintetében. Mindezt a transzkripciós vizsgálatok csak további, számos esetben ismeretlen izoformákkal bővítették.

A tapasztalt diverzitás hátterében nyilvánvaló a búza allohexaploid, s utólag is számos introgresszióval frissített genomjának hatása, amelyben a homeológok egymásrahatása csak sokszorozhatja a találatok bizonytalanságát, mind a lehetséges variabilitás, mind a szabályozások összehangolt volta tekintetében. Bár a di- ill. tetraploid ősök párhuzamos térképezése és a búza genomi analízise nemzetközi szinten, új generációs szekvenálási technológiák felhasználásával gőzerővel folyik, várhatóan még jópár évnek kell eltelnie ahhoz, hogy legalább egy fajta teljes genomjával tisztában lehessünk.

Ugyanakkor vizsgálataink kapcsán nyilvánvaló kérdésként fogalmazódik meg, hogy az apoplasztikus endo-1,3-glükanázok ill. kitinázok aktivitás-assay-eiben megfigyelt genotípusfüggő indukciós különbségek az egyes glükanáz / kitináz izoformák általánosan sikeresebb indukciójának köszönhetőek, vagy csak egy/néhány izoforma biztosítja ezt a szignifikáns eltolódást a fogékony Thatcher-ben indukált válaszhoz képest. A megoldás elvben triviális: fel kell állítani egy-egy izoformára specifikus RT-qPCR rendszereket. Eddigi tapasztalataink szerint ennek gyakorlati megoldása óriási kihívás, mert egyre újabb és újabb, az adatbázisokban egyáltalán nem, vagy csak klóntárakban szereplő szekvenciavariánsokat azonosítunk az eredetileg csak megerősíteni kívánt expressziójú transzkriptumok mellett, illetve a primerspecificitás minimálisan elegendő fokának tesztelésére kényszerülünk a feltételezhető további homológok miatt. További problémaként jelentkezik, hogy egy megbízható referenciagén kiválasztása, mert a klasszikusan jó-közepes megbízhatósággal szereplő ubiquitin biotróf patogénünkre kifejezetten érzékenyen indukálódik.

Ha sikerül azon izoformákat behatárolni, amelyek egy-egy PR családból ténylegesen felelőssé tehetőek a korábbi vagy jóval erőteljesebb indukcióért, akkor – az addigra vélhetően már megszekvenált genomi régiók ismeretében - promóter-analízissel végre tisztázhatóvá válik az egyes izoformák genotípus- és stresszfüggő indukálhatósága és a stresszválaszban betöltött szerepe. Így kiderülhet, hogy a közel izogén vonalak stresszválasza között egy adott jelátviteli útvonal hatékonyabb korábbi aktiválása okozza-e a különbséget, vagy esetleg további, más útvonalon (is) érzékenyíthető izoformák additív aktiválása áll a középpontban.

Ebben nemcsak az ismert növényi cisz-regulátor elemek tárhelyei ill. motívumkereső adatbázisai (pl. *PLACE, PlantCare*) állhatnak rendelkezésünkre, hanem egy-egy komplexebb kérdés megválaszolására is alkalmas, egyedi algoritmusok is komoly segítséget jelenthetnek. Jövőben tervezett vizsgálatainkhoz az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetével kooperációban egy Dr. Györgyey János munkacsoportjában Cserháti Mátyás által kifejlesztett, ún. "tetramerdiád" analizáló programot van lehetőségünk alkalmazni. Ez statisztikai és bioinformatikai módszerek kombinálásával nemcsak már ismert motívumok lokalizálását, hanem potenciális regulátor-elemek predikcióját és előfordulásuk gyakoriságának összevetését is képes, egy meglehetősen széles (5' upstream  $\leq 2$  kbp) szabályzórégióra kiterjedően kivitelezni. Az algoritmus korábban már sikerrel bizonyított: a rozsdafertőzés kapcsán proteomikailag azonosított 6 PR-fehérjecsalád (PR1, 2, 3, 4, 5, 9) érintett képviselőinek rizs-ortológjaiban több olyan ismert motívumot ill. eddig ismeretlen szabályzó-elemet (vagy részletet) is megnevezett, amelyek közrejátszhatnak az evolúciósan egymástól igen távoli, inkább csak funkcionális szerepvállalásukban rokonítható PR családok megfelelő képviselőinek párhuzamos indukciójában.

B. A 'Chinese Spring' búzafajta levelén indított, proteomikai referencia apoplaszt-térképezés nyilvánvalóan folytatást igényel, hiszen vizsgálataim csak a fehérjék egy töredékére terjedtek ki. Nyilvánvaló problémaként jelentkezik azonban több fehérjénél is a gyenge lefedettség, melynek hátterében egyrészt az a tény áll, hogy a stresszfolyamatokkal asszociált fehérjék kutatása érthető módon több évtizedes előnyt élvez a normál biokémiai ill. anyagcserefolyamatokban közreműködő, lokálisan illetve a differenciáció különféle stádiumaiban kifejeződő fehérjék és

génjeik vizsgálatával szemben. Még nagyobb akadályként jelentkeznek az adatbázisok már többször említett hiányosságai és a genom komplexitása

Véleményem szerint a metodikai és bioinformatikai háttérfeltételek birtokában, de a fajt érintő adatbázis-információk korlátozottságának jelenlegi fokán búza esetében egy végleges referenciatérkép előállítása nem lehetséges, a további analízisek azonban érdemben hozzájárulhatnak egy ilyen térkép jövőbeli megalkotásához. A további vizsgálatok terén két fontos feladatot szeretnék kiemelni. (1) Sürgető, kötelező érvényű feladat a független izolátumokból ill. különböző futtatásokból nyert mintázatok közti pozícionális ill. intenzitásbeli variancia kiszűrése, azaz a gélek statisztikai kiértékelése és egy standardizált mestergél megalkotása. (2) Amíg a genomi, EST- vagy fehérje-adatbázisok terén nem várható érdemi előrelépés, az eszköztár bővítése céljából alternatív technológiák (pl. immunológiai eljárások) segítségét célszerű igénybe venni, a kérdéses vagy egyelőre ismeretlen fehérjék kimutatása, karakterizálása, vagy *in situ* lokalizációja és interakcióinak feltérképezése céljából. Ehhez tanszékünkön monoklonális ellenanyagok előállításával az első lépéseket megtettük.

C. Egy nehézfémre érzékeny árpafajta, a 'GK Mandolina' kadmiumstressze kapcsán a levél intercelluláris folyadékából hat különféle, eredendően patogenezissel összefüggésben leírt fehérjecsalád (a PR1, -2, -3, -4, -5 és -17) különböző izoformáit azonosítottuk, ami azt mutatja, hogy a kadmiummal asszociált növényi védekezésnek egy általánosabb stresszválasz is részese. Az utóbbi két évtized jelátviteli kutatásainak és különösen az elmúlt pár év stresszszignál-interakciókat érintő, mélyebb analíziseinek tükrében úgy tűnik, bizonyos PR fehérjék meglehetősen sztereotípnak tűnő indukálódása a nehézfémstresszekre is jellemző, és az is elképzelhető, hogy a nevezett fehérjéknek valóban releváns, és az eredetinél komplexebb helyük is lehet a védekezésben.

Feltételezzük ugyanakkor, hogy abban az esetben, ha az apoplasztnak nem kizárólag a viszonylag csekély ionerőnél könnyen kimosódó fehérjefrakcióját vizsgáljuk, hanem a sejtfalhoz szorosabban kötődő frakciót is bevonjuk az analízisekbe, akkor nehézfémstresszre, sőt akár a Cd<sup>2+</sup>-ra specifikus változásokat is detektálhatunk egyes proteinek megnövekvő vagy éppen csökkenő kifejeződése, változó aktivitása vagy mobilitása tükrében. Annál is inkább, mert széles körben dokumentáltak egyes nehézfémek sejtfal-sejtmembrán rigiditására gyakorolt hatásai, melyek a vizsgált szövet ill. szerv szintjén jellegzetes morfológiai elváltozásokhoz is vezethetnek. A kadmium- ill. nehézfém-specifikusan indukálódó stresszfehérjék vizsgálatát célszerű a gyökér apoplaszt és az exudátumok elemzésére kiterjeszteni.

134

A konkrét kísérleti területeken esedékes vizsgálatokon túl általánosabb kérdések is felvetődnek. Eredményeink ugyanis azt jelzik, hogy nemcsak patogénfertőzések, de nehézfém-stressz is képes olyan jelátviteli útvonalakat aktiválni, amelyek a PR fehérjék sztereotipnak tűnő kifejeződéséhez vezetnek. Ezen túlmenően, egészséges növények állandó jelleggel, a preformált védekezés részeként is szekretálhatnak ugyanilyen vagy hasonló fehérjéket, amelyek egy potenciális stresszfaktor fellépésekor védő szereppel bírnak. Felmerül tehát a kérdés, hogy célszerű-e megkísérelni a növény általános védelmi szintjének tartós megemelését. A kérdés azért is aktuális, mert az irodalomban és hazánkban is folynak ilyen irányú vizsgálatok. Az előző fejezethez kapcsolódva, azaz a "fémterápiát" mint potenciális eljárást konkrét példaként használva véleményem szerint egyértelmű a válasz: biztosan nem!

A "fémterápia" lehetősége ill. a nehézfémeket hiperakkumuláló növények patogén-kontrolláló céllal való felhasználása mind ökológiai, mind élelmezésbiztonsági szempontból kétséges. Utóbbi tekintetben az sem mellőzhető, sőt különösen is kiemelendő, hogy a szisztemizálódó és részben általános jellegűvé váló stresszválasz során felgyülemlő PR fehérjék közt igen gyakoriak a légúti vagy élelmiszer-allergének (Hoffmann-Sommergruber 2000, Breiteneder 2004, Palomares et al. 2008). A jelenség hátterét a 35. ábra szemlélteti.



**35. ábra:** A növényi védekezésben szerepet játszó, sokféle stresszel összefüggésben specifikáltan vagy sztereotip módon indukálódni képes PR fehérjék, melyek evolúciós szerológiai rokonságukból fakadóan humán-allergén kockázati tényezőként is szerepelhetnek. (*Forrás: http://dmd.nihs.go.jp/latex/defense-e.html*)

Így, ha a környezetszennyezés hatásait nem is tekintjük, mindenképp fizetnünk kell a természetesen indukált vagy éppen géntechnológiai alapon biztosított növényi védekező mechanizmusokért:

- a mezőgazdasági növények csökkenő növekedési és magprodukciós rátájával,
- az elsődleges fogyasztókban (állatok és emberek) generált, emésztést gátló és egyéb antinutritív hatásokkal,
- egy szükségtelenül provokált, a humán népességre nézve új allergén potenciállal.

Mindazonáltal igaz, hogy e védekező fehérjék a növény természetes védelmi vonalának fontos részét képezik, és eliminációjuk vagy koncentrációjuk csökkentése csak akkor lehetséges, ha a növény számára a környezeti erőforrások kárára optimális környezeti feltételeket biztosítunk, ill. vegyszeres növényvédelmi eljárásokat alkalmazunk. Mindez azonban annak az esélyét is felveti, hogy egyúttal az érintett fajokkal egyoldalú vagy kölcsönös függésben evolválódott egyéb fajok ill. populációk túlélését is befolyásoljuk. Jövőbeli célunk tehát mindenekelőtt a folyamatok jobb megértése, a védekező fehérjék időben/helyileg behatárolt indukciója és általánosságban, az ismeretalapú, óvatos beavatkozás kell, hogy legyen.

Kísérleteink egy másik, általános ismeretelméleti kérdést is felvetnek. Közel izogén, de ellenállóképességük terén érdemi eltérést mutató búzavonalak fehérje és RNS szintű vizsgálatai azt mutatták, hogy – legalábbis a PR fehérjék szintjén – feltehetőleg nem annyira egy-egy specializált, egyedi funkciójú vagy kiemelkedő katalitikus hatékonyságú protein jelenléte vagy hiánya, sokkal inkább a védekezésben közreműködő PR fehérjecsaládok közel rokon izoformáinak induktivitásbeli érzékenységben vagy expressziós hatékonyságában mutatkozó eltérések befolyásolják a stresszválaszok kimenetelét.

A különféle rezisztenciaformákhoz kulcsot nyújtó kritikus szabályzási pontok megtalálása tehát kiemelkedően fontos, ehhez viszont nélkülözhetetlen a rendszerbiológiai közelítés:

- A genomi szabályzórégiók térképezése és jellemzése átfogó és egyben összehasonlító nemzetközi genomtérképezési projekteket kíván, az adatbázisok gyors fejlesztéséhez pedig az új generációs szekvenálási technikák bevonását igényli.
- A transzkripciós aktiválás dinamikájának, valamint az expressziós eltolódás anyagcserében elfoglalt szerepének szisztematikus és finom léptékű analízise jelenleg leginkább expressziós array-ek felületén tűnik megvalósíthatónak.
- A szabályozás kivitelezését végző fehérjék és potenciális nukleinsav-, fehérje- vagy metabolit partnereik interakcióinak feltárása, lokalizációja és befolyásolhatósága tekintetében pedig a proteomikai alkalmazások biztosíthatják az utat a sejt- és szervezetszintű anyagcserét modellező bioinformatikai hálózatok kiépüléséhez.

# 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### A.) A levélrozsdafertőzés kapcsán búzában indukálódó stresszválasz témakörében

- Levélrozsda-fertőzéssel összefüggésben 7 funkcionális proteincsoport, köztük GDSL-szerű lipázok és 6 konvencionálisan is patogenezissel társítható, ún. "PR" család apoplasztba szekretálódó, minimálisan 24 proteinjének megváltozott expresszióját mutattuk ki az eltérő ellenállóságot mutató, Thatcher-alapú búzavonalakban: GLIP - ABL11233; PR1 -AA07473, AAK60565/AAP14676; PR2 - AAY88778/AAY96422, CAA77085, CAI64809, AAD28732, BAE96089, továbbá ABB96917; PR3 - BAB82471, AAG53609, AAD28733; PR4 - 2209398A/O64393, AAS78780, O64392; PR5 - AAK55326, AAK55325/AAB71680, CAA66278, AAK60568; PR9 - CAA59486, AAW52716, AAW52720, CAA59485, Q05855.
- 2. Ezek közül egy PR3 típusú kitináz (BAB82471) indukcióját mindhárom közel izogén vonalban, legalább egy PR2 endo-1,3-glükanáz (AAY88778/AAY96422) és két PR1 (CAA07473, AAK60565/AAP14676) fehérje akkumulációját pedig mindkét rezisztens genotípusban bizonyítottuk tömegspektrometriai úton. E fehérjék a fertőzést követően a rezisztens vonalakban korábban és/vagy nagyobb mennyiségben expresszálódtak, mint a Tc-ben.
- A tömegspektrometriailag azonosított kitinázok és 1,3-endoglükanázok szekvenciájából levezetett primerek segítségével igazoltuk a keresett izoformákkal azonos (*Chi1* AB029934 és *Chi IV* AF112966), illetve azoktól néhány pozícióban eltérő transzkriptumok jelenlétét (*TaGlb2a* AB244637 helyett *TaGlb2b* AB244638.2 Δ: 0 nt és *TaGlb2f* AB244642 Δ: 1 nt, továbbá *beta-glucanase* Y18212 Δ: 2-2 nt és DQ090946/DQ078255 Δ: 3-4 nt).

4. Bizonyítottuk, hogy a nem fertőzött csíranövények β-1,3-endoglükozidáz és endokitináz aktivitása mindhárom vizsgált vonalban egyformán alacsony, patogénfertőzés hatására azonban megnő és genotípus-függő eltéréseket mutat. Elsőként detektáltuk, hogy a vizsgált enzimek a levélrozsda-rezisztens Lr1 és Lr9 vonalak apoplasztjában a fertőzést követően szignifikánsan nagyobb aktivitással indukálódnak, majd tartósan magasabb aktivitás-szinten maradnak, mint a közel izogén Tc vonal sejtközötti állományában. Proteomikai és transzkriptomikai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a megemelkedett aktivitáshoz a *Chi1* és a *TaGlb2b, 2f* illetve 2*a* géneknek az Lr9 rezisztens vonalban történő kifejeződése biztosan hozzájárul.

#### B.) A kadmium stressz kapcsán árpában indukálódó fehérjeválasz témakörében:

- A kadmium-stresszelt árpa (cv. Mandolina) sejtközötti állományában kimutattuk, hogy az egy hetes kezelés során számos fehérje expressziója mutat a Cd-koncentráció függvényében folyamatos változást, általában növekedést. Ezek közül 1D- majd 2D-elválasztás után két 1-3-glükanázt (PR2 család - 1607157A és P15737/AAM75342), két kitinázt (PR3 család -CAA55344 és CAA55345) és további két kitin-kötő fehérjét (PR 4 család - CAA71774, P28814), két PR1 proteint (CAA52893, P35793) és különösen nagy számban taumatinszerű (PR5) fehérjéket (pl. AAB71680, AAK55325, AAK55326) sikerült azonosítanunk. Kimutattuk még egy PR17 protein (ABV22582) és egy egyelőre ismeretlen funkciójú, de szekvenciája alapján utóbbi családdal rokon, az antimikrobiális BSP fehérjék közé tartozó protein (CAA74594) jelenlétét is.
- 2. Ezzel az irodalomban első ízben analizáltuk a kadmiumra adott extracelluláris stresszválaszt proteomikai módszerekkel árpa levélben, és a kis ionerővel kimosható frakciót elemezve megállapítottuk, hogy ott a növény általános védekezésében résztvevő, azaz nem a kadmiumra specifikusan reagáló PR fehérjék (is) indukálódnak.
# C.) A búza referencia-apoplaszt proteomikai térképezése témakörében:

- Az egészséges cv. 'Chinese Spring' búza csíranövény apoplasztjának kétdimenziós proteomikai térképezése során eddig 11 folt esetében sikerült releváns, bizonyíthatóan szekretált fehérjének megfeleltethető homológ szekvenciákat azonosítani. A 11 foltnak megfeleltethető 9 protein egyrésze a növényi sejtfalszerkezet átalakításában működik közre (arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II AAK21880, alpha-L-arabinofuranosidase / beta-D-xylosidase isoenzyme ARA-I AAK38481, beta-D-xylosidase ABA92796, (1,3;1,4)-beta-glucanase CAA80493, beta-D-galactosidase BG904072\*) és főként normál anyagcsere-folyamatokban érintett vagy pl. endogén elicitorképzőként funkcionálhat. Egy további körük kifejezetten a mikrobiális kórokozók és rágó kártevők elleni preformált védekezést szolgálhatja (alpha-amylase inhibitor / endochitinase P15326, putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase CAI64809). Az azonosított proteinek között szerepel továbbá egy multifunkciós, pl. fenoloid anticipinek glikozilálását elősegítő protein (adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase CAC85479) és egy ismeretlen, de a PR17 családdal szekvenciálisan rokon fehérje (hypothetical protein CAA74594).
- 2. A vizsgált fejlődési stádium apoplasztjában dominánsnak tűnő ADP-glükóz pirofoszforilázról (CAC85479) két, a germinszerű proteinekre jellemző konzervatív box (B és C), valamint egy sejtadhézióban szerepet játszó KGD motívum azonosításával valószínűsítettük, hogy a germinszerű fehérjékhez sorolható s így potenciálisan a PR16 család képviselője.

# 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkámban olyan stresszfehérjék proteomikai azonosítását tűztem ki célul, amelyek a növény elsődleges védelmi vonalaként is számon tartott sejtközötti állományban, az apoplasztban kifejeződve képesek a növény stresszállapotának érzékeny leképezésére. Elsőrendű célunk olyan fehérjemintázatbeli elváltozások azonosítása volt, amelyek a rezisztenciával asszociáltak, hogy a fehérje funkcióját és a kódoló gént/szekvenciát beazonosítva potenciálisan stressz- vagy rezisztencia-specifikus fehérjemarkereket nyerhessünk. Távlati célként elindítottuk a referencia apoplaszt térképezést is.

A biotikus stresszválaszt a búza – levélrozsda kölcsönhatásban analizáltuk, a búza (*T. aestivum*) közel izogén, Lr1 és Lr9 rezisztenciagént hordozó vonalain, valamint a fogékony 'Thatcher' alapfajtán. A levélrozsda-fertőzéssel összefüggésben, proteomikai alapon 7 funkcionális proteincsoport (köztük 6 patogenezissel társítható, ún. "PR" család) apoplasztba szekretálódó 24 proteinjét mutattuk ki az eltérő ellenállóságot mutató, 'Thatcher' alapú búzavonalakban. Ezek közül az endo-1,3-glükanázok (PR2) és kitinázok (PR3 ill. PR4) esetében aktivitásvizsgálatokkal is bizonyítottunk genotípus szintű ill. rezisztenciára vagy fogékonyságra jellemző eltéréseket.

A fehérje-szinten kimutatott expressziós változások megerősítésére és dinamikájuk követésére, továbbá az aktivitás-assayek alapján feltételezett további esetleges izoformák indukciójának feltárására glükanázok és kitinázok esetében génexpressziós vizsgálatokat is végeztünk a fogékony Tc ill. az Lr9 rezisztens vonalon. A tömegspektrometriailag azonosított kitinázok és glükanázok triptikus peptidjeiből levezetett szűkebb vagy szélesebb specificitású primerekkel néhány izoforma esetében a keresett búza-transzkriptumokat vagy azok szintén annotált, közeli homológjait amplifikáltuk. További klónok szekvenálásával az NCBI fehérje-adatbázisban még nem szereplő 4 új búza kitináz és 3 glükanáz izoforma transzkriptumának jelenlétét is bizonyítottuk, melyek a TIGR EST-adatbázisban megfelelő illetve közeli TA-homológokkal rendelkeznek. Génexpressziós analíziseink (RT-PCR) megerősítették és kiegészítették proteomikai eredményeinket abban az értelemben, hogy igazolják: a levélrozsda-fertőzés kapcsán indukálódó stresszválaszban egyazon fehérjecsalád többféle izoformája is kifejeződik egyidejűleg, másrészt a proteomikailag feltárt sokféleséget a transzkriptumok analízise tovább bővíti, néhány további, eddig fehérje- vagy érett mRNS-szinten nem ismert génvariáns azonosításával.

A genotípusra jellemző expressziós eltérések bizonyítását RT-qPCR révén, míg az eltérő expresszió hátterében álló szabályozási különbségek részleteinek megismerését promóter-analízissel látjuk megvalósíthatónak. Ennek azonban alapvető feltétele a potenciálisan expresszálódó izoformák

érdemi elkülöníthetősége, amit jelenleg a búza adatbázisok kódoló és szabályzószekvenciák terén is fennálló hiányosságai nem tesznek lehetővé.

A stresszfaktorok hatásának megbízható proteomikai kimutatásához elengedhetetlen a referenciatérképek elkészítése. Ezért kezdtünk referencia-apoplaszt fehérjetérképezésbe a genetikai kutatásokban a búzafajták közt leginkább preferált cv. 'Chinese Spring' egészséges csíranövényein. Az eddigiekben azonosított 9,relevánsnak tűnő apoplasztfehérje között a növényi sejtfalszerkezet szénhidrát-szerkezetének átalakításában közreműködő, továbbá mikrobiális patogének és rágó kártevők ellen hatékony illetve multifunkciós, normál és kórélettani vonatkozásban is potenciálisan hasznosuló fehérjék is szerepelnek. Mivel az azonosítás – elsősorban a búza szekvencia-adatbázisok ill. homológok hiányosságai miatt – a detektált sokféleség ellenére számos nehézségbe ütközött, a célzottabb vizsgálatokhoz a jövőben monoklonális ellenanyagok felhasználását tervezzük. Néhány hibridomavonalat csoportunkban már előállítottunk, specificitásuk pontos jellemzése folyamatban van.

A nehézfémek növényi fiziológiára gyakorolt hatásainak több évtizedes tanszéki kutatási hagyományát követve, abiotikus stressztényezőként kadmiumkezelés (0-300 μM) hatásait vizsgáltuk az apoplaszt fehérjemintázatára árpa (*H. vulgare* cv. 'Mandolina') csíranövényeken, a búzára kidolgozott intercelluláris folyadék kivonási eljárást árpára adaptálva. A választott rendszer előnyeként határozható meg a nehézfém-kezelés egyértelmű, vízkultúrás lehetősége, a fehérjék azonosításának alapját képező árpa szekvencia-adatbázisok búzáéhoz viszonyított fejlettsége, és a konkrét rendszert jellemző stresszélettani háttér felderítettebb volta (szövettani, enzimaktivitás- és stresszmetabolit-szintű jellemzettség), amely eredményeink stresszválaszban való elhelyezésének lehetőségét nagyban megkönnyíti.

Az árpa csíranövények leveléből kinyert intercelluláris folyadék 1- és 2-dimenziós gélelektroforézise a sejtközötti állomány fehérjemintázatát érintő drámai változásokat hozott felszínre a kadmium kezeléssel összefüggésben. Eddigi tömegspektrometriai (MS) eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a Cd<sup>2+</sup> által kiváltott védekezési reakciónak az apoplasztban egy általános jellegű stresszválasz is része, melyben több, patogenezis kapcsán indukálódó, ún. PR fehérjecsalád is szerepel. Ennek megfelelően, a kadmium-stresszelt árpa sejtközötti állományban bizonyos PR1 proteinek, továbbá 1,3-glükanáz (PR2), kitináz (PR3, PR4) és különösen nagy számban taumatinszerű (PR5) fehérjék intenzitásnövekedését sikerült kimutatnunk, valamint egy PR17 és egy ezzel szekvenciája alapján szorosan rokonítható, s az antimikrobiális, bázikus, szekretált típusú (BSP) fehérjék közé tartozó, de egyelőre még ismeretlen funkciójú, proteint. A szakirodalom

alapján várható, indukálódó peroxidázok (PR5) különböző szekretált válfajai nem szerepeltek az eddig analizált minták között.

A biotikus ill. abiotikus stresszválaszban közreműködő apoplaszt fehérjék felderítését célzó, proteomikai kutatásaink vonatkozásában eredményeink azt jelzik, hogy nemcsak patogén fertőzések, de nehézfém-stressz is képes olyan jelátviteli útvonalakat aktiválni, amelyek a PR fehérjék sztereotípnak tűnő kifejeződéséhez vezetnek. Ezen túlmenően, egészséges növények állandó jelleggel is szekretálhatnak olyan fehérjéket, amelyek (vagy közvetlen rokonaik) egy potenciális stresszfaktor fellépésekor védő szereppel bírnak.

A stresszel szemben ellenálló, toleráns ill. fogékony egyedekben kifejeződő, hasonló vagy akár megegyező funkciót ellátó PR izoformák expressziójának eltérései azonban érdemben befolyásolhatják a védekezési válasz sikerét. Ezért fontos jövőbeni feladatnak tekintjük az adott válaszreakcióban indukálódó izoformák pontos beazonosítását, a védekezéshez való individuális hozzájárulásuk mértékének és időbeliségének meghatározását, továbbá közös ill. eltérő promóterelemeik azonosítását.

# 9. MELLÉKLETEK

# M1. Az azonosított búza ill. árpa apoplasztfehérjék szakirodalmi és funkcionális relevanciája

# M1.1 A levélrozsdával asszociáltan indukálódó búza apoplasztfehérjék

A levélrozsda-fertőzés kapcsán növekvő intenzitást mutató, proteomikailag azonosított fehérjék lehetséges vagy bizonyított PR jellegét, illetve ezen belül antifungális szerepét szekvenciális és funkcionális rokonságuk alapján felosztva, és a vizsgált genotípusok szerinti előfordulásuk gyakorisága sorrendjében tárgyaljuk.

#### Kitinázok

Bár a mindhárom fertőzött vonal apoplasztjából izolált kitináz 1-re nem, a tömegspektrometriai adatok alapján valószínűsített két további, Lr9-ből kimutatott kitináz szekvenciáinkra szakirodalmilag is alátámaszthatjuk a gombafertőzés kiváltotta, konkrét indukciót: a chitinase IV-t (a korábban már említett, egyik 1,3-glükanázzal egyetemben) *Fusarium* gombafertőzés kapcsán mutatták ki cv. 'Sumai 3' búzafajtában (Li *et al.* 2001), míg a ~35 kDa méretű endokitinázunkkal közeli rokon búza 1b endochitinase-t 'Chinese Spring' búzafajtában a feketerozsda (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) fertőzésével asszociáltan publikálták (Liao *et al.* 1994).

#### Glükanázok

Az Lr1 és Lr9 vonalban egyaránt kimutatott endo-1,3-glükanáz(ok) PR2 jellegét, azaz stresszválaszban való relevanciájukat erősíti, hogy az AAY88778 ill. AAY96422 szekvenciákat transzkriptum formában, eredetileg *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (búza sárgarozsda) fertőzte búzalevelek génexpressziós analízise kapcsán azonosították. Az egyelőre csak a fertőzött Lr9 genotípus apoplasztjából kimutatott 4 további glükanáz közül az AAD28732 protein gombafertőzéssel feltételezett szerepére *Fusarium*-fertőzött cv. 'Sumai 3' búzafajta kalászvirágzatából származó cDNS klónok izolálásával mutattak rá (Li *et al.* 2001). Továbbá, a BAE96089 protein génszintű felfedezése, PR-2 osztályba illesztése és megnövekedett génexpressziójának igazolása is eredetileg *Erysiphe graminis* (gabona lisztharmat) fertőzte levelekből történt meg, cv. 'Norin 61' búzafajtán (Higa-Nishiyama *et al.* 2006).

Mivel az eddigiekben felsorolt fehérjék cDNS-ből levezetett módon (konceptuális transzlációval) kerültek az NCBI adatbázisba, jelenlétüket – a cv. 'Thatcher' alapú Lr1 ill. Lr9 vonalban – immár protein szinten is megerősíthetjük.

A rendszerünkben kizárólag a fogékony Tc vonal extracelluláris stresszválaszára jellemzőnek talált endo-1,3-1,4-glükanáz fehérje (CAA80493/ABB96917) gombapatogén elleni relevanciájának témájában kissé más a helyzet. A magasabbrendű növényekben általános (Simmons *et al.* 1994) endo-1,3-glükanázokkal (EC 3.2.1.39) szemben a kizárólag fűfélékre jellemző (Buckeridge *et al.* 2004) endo-1,3-1,4-glükanáz(ok) (EC 3.2.1.73) szerepe a stresszválaszban egyelőre kevéssé ismert (Simmons *et al.* 1994, Romero *et al.* 1998). Jelenlétük leginkább az endospermiumban és a sziklevélben jellemző, a helyi szinten nagy mennyiségben felgyűlő béta-1,3-1,4-glükánokkal összhangban (Carpita 1996), de néhány képviselőjük kifejezetten csíranövények szöveteiben (pl. az árpa *EI* – fiatal levél), mások (pl. rizs *OsEGL2*) érőfélben lévő generatív szövetekben expresszálódnak, és szélesebb specificitású képviselőt is ismerünk (pl. rizs *OsEGL1* - gyökér, levél). Kifejeződésükben elsősorban differenciálódást irányító fitohormonok (gibberellinek, abszcizinsav; auxinok) iránti érzékenységet mutattak ki (Slakeski és Fincher 1992, Wolf 1992, Thomas *et al.* 2000). Emiatt feltételezik, hogy a csírázásban, illetve a főként a vegetatív sejtek megnyúlásában játszanak szerepet.

Egyes rizs endo-(1,3;1,4)-glükanáz génekről ugyanakkor kimutatták (Simmons et al. 1992, Akiyama et al. 2009), hogy leginkább sérülés, illetve különféle stresszhormonok aktiválják kifejeződésüket (Gns1 - sebzés, SA, ET, sötétkezelés, gomba eredetű elicitorok; OsEGL1 - Me-JA, ABA ill. ethephon). Funkciójukat ciszgénikus rendszerben vizsgálva, a Gns1 konstitutívan szekretált, rekombináns formáját expresszáltatva két rizsfajtában is sikerült igazolni rezisztencianövelő hatást a Magnaporthe grisea két virulens gombatörzsével szemben (Nishizawa et al. 2003). Ezzel összefüggésben rezisztencia-típusú léziókat és két védekezés kapcsán indukálódó gén, egy PR1 és a PBZ1 korábbi aktiválódását figyelték meg. Egyelőre azonban nem nyilvánvaló, hogy a fehérje közvetett úton vagy konkrét, gomba eredetű szubsztrátot felhasználva gyakorol gátló hatást a gombapatogénre. Az evolúciós tekintetben endo-1,3-glükanázokból levezethető enzimcsoport direkt antifungális szerepkörének lehetőségét ugyanakkor több, jellemzett bakteriális homológ is megerősítheti: Yao és mtsai (2004) a rizs rizoszféráját kolonizáló Paenibacillus *polymyxa* egy baktériumtörzséből olyan, a fajban korábban leírt béta-1,3-1,4-glükanáz (gluB) géntermékével (>80 %-os) szekvenciális azonosságot mutató fehérjét (P2) izoláltak, amely in vitro erőteljes gátlást fejtett ki a patogén *Pyricularia oryzae* gombatenyészetek növekedésére. Kitamura és Kamei (2006) pedig egy tengeri *Pseudomonas* baktériumból származó, *E. coli*-ban kifejeztetett

és izolált, rekombináns béta-1,3-1,4-glükanáz fehérjével (GluA) olyan erőteljes degradációt ért el a *Pythium porphyrae* gomba sejtfalában, amely még az azonos törzsből származó chitinase A ill. beta-1,3-glucanase B enzimek hatékonyságát is jóval meghaladta. S, bár bakteriális béta-1,3;1,4-glükanázok növényi kifejeztetése elsősorban a takarmány könnyebb hasznosítása miatt került előtérbe, transzgénikus növényi vonalakban expresszáltatott, rekombináns formáik hatását a Giessen-i Egyetemen Karl-Heinz Kogel munkacsoportja már a befogadó növényfaj patogénjei ill. szimbionta gombapartnerei kapcsolatára is teszteli (GMO Safety 2009).

Mindezek alapján igen valószínű, hogy a gombák, de legalábbis egyes csoportjaik sejtfalában 1,3-1,4-glükánok is jelentősebb mennyiségben fordulnak elő, s ezek képezhetik a stressz kapcsán indukálódó növényi endo-1,3;1,4-glükanáz típusok célmolekuláit is. Fontaine és mtsainak 2000-es bejelentése, miszerint *Aspergillus fumigatus* lúggal nem feltárható sejtfal-frakciójában a vázszerkezet oldalláncainak egy jelentős komponensként lineáris béta-1,3-1,4-glükánt is izoláltak, szintén ezt a feltételezést erősíti.

#### PR1 fehérjék

A PR 1 család általunk Thatcher-alapú Lr1 és Lr9 búzavonalban azonosított tagjait korábban már 'Kanzler' búzafajtában (CAA07473), *Haynaldia villosa* egy 6VS/6AL transzlokációs vonalában (AAK60565), ill. 'Tadinia' búzafajta *Septoria tritici* levélfoltossággal szemben ellenálló (Stb4) vonalában (AAP14676) is kimutatták a gabonafélék rokonsági körében. Tekintetbe véve a 2 rezisztens vonal közel izogén genetikai hátterét, továbbá az Lr1 és Lr9 gén különböző donor fajait ill. eltérő kromoszómális lokalizációjukat, ez a PR1 géncsoport a fogékony 'Thatcher' fajtában is biztosan kódolt, annak ellenére, hogy SDS-PAGE-n (10. és 12. ábra) nem találtuk nyomukat. Úgy tűnik, hogy a két rezisztenciagén – feltételezhetően közös jelátviteli útvonalon – a levélrozsdafertőzés során nagyságrendekkel erősebb hatékonysággal képes indukálni expressziójukat.

A több patogéntípusra nézve is (pl. gombák, viroidok stb.) ismerten antimikrobiális, de máig ismeretlen hatásmechanizmusú PR1 fehérjék *antifungális* szerepkörének lehetséges magyarázatára extracelluláris SCP-doménjük alapján legújabban membrán- ill. sejtfal-permeabilizáló, endopeptidáz aktivitásukat feltételezik (Park *et al.* 2010). Ilyen értelemben funkcionálisan homológok lehetnek a PR-7 család tagjaival, azaz a szubtilizinszerű Ser-proteázokkal, melyek ellen már azonosítottak gomba eredetű proteáz inhibitorokat (Tian *et al.* 2004).

#### Peroxidázok

A peroxidázok biokémiai és molekuláris biológiai kutatások kedvelt alanyai, kezelésükkel és besorolásukkal (származásuk, lokalizációjuk, funkcióik és szabályzásuk szerint) külön adatbázis (*PeroxiBase*) foglalkozik. A redoxi-viszonyok kézbentartása az egészséges sejtek feladatköreinek szerves és állandó részét képezi, legtöbbször az oxidatív jellegű folyamatok ellenőrzött működtetése érdekében, melyet normál anyagcsere-folyamatok és számos környezeti tényező is veszélyeztethet. A biotróf patogénekre adott stressszválasszal ill. a hiperszenzitív reakcióval összefüggésben egyre nyilvánvalóbb, hogy a redox-egyensúly ideiglenes, több szakaszból álló oxidatív megbomlása és utóbb meginduló, reduktív visszarendeződése is stratégiai fontosságú a védekezésben. A citoprotektivitás azonban a sejtközötti és a sejtes állományban esetenként redoxi szempontból is másként definiálható. Emiatt azonosított peroxidázaink konkrét szerepének (szubsztrát?) és sejtes szintű lokalizációjának (IC/EC?) bizonyítása, ill. egyáltalán, aktuális indukciójuk (PR-jelleg?) igazolása sem könnyű feladat a vizsgált rendszerünkben.

Korábban említettük, hogy a Liu és mtsai (2005) által felállított, *T. monococcum, Oryza* ill. *Arabidopsis* szekvenciákra épülő peroxidáz-törzsfán az Lr9 vonalban levélrozsda-fertőzéssel összefüggőnek talált 5 POD búzafehérjénk mindegyike az 1. klaszterként definiált peroxidázgéncsoportban foglal helyet. Ezen fehérjék közös, más klaszterekre nem jellemző bélyegei, hogy Cterminális elemet (CTE) nem, de N-vég terminális szignálpeptidet (NPP) hordoznak, legfőképp a mezofillum sejtekben expresszálódnak, s a további, azonosított klaszterek (II-IV.) tagjaitól eltérően(!) feltételezhető, hogy valóban az apoplasztba szekretálódnak - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést elősegítő funkcióval, indukált sejtfal-appozíciók képzésében is részt vállalva. A feltételezést alátámasztja, hogy a *cluster I* tagjainak jelenléte a lisztharmatfertőzésnek csak egy korai szakaszában volt jellemző, és rezisztencia esetén expressziójuk hamar visszafordult a spórafejlődés letörését követően. Ezzel szemben, a szekvenciálisan a *cluster II-IV*-be sorolt peroxidázok mindvégig erősebben expresszálódtak a fertőzés alatt, mely arra utalt, hogy előbbivel egyező besorolásuk (III. osztály "szekréciós peroxidázok") ellenére utóbbiak inkább vakuoláris jellegűek és - a ROS károsító hatásait H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t lebontó aktivitással mindvégig ellensúlyozva - az optimális *intra*celluláris redoxállapotot biztosítják az epidermiszben.

Az irodalmi adatokat és saját eredményeinket figyelembe véve, izolált peroxidázaink indukálhatósága ill. levélrozsdarezisztenciával kapcsolatos relevanciája kapcsán az alábbi megjegyzéseket tehetjük:

Liu és mtsai (2005), génexpressziós vizsgálataik alapján az általuk *cluster I*-be sorolt hat TmPRX génből (1-6) csak egy gént, a szekvenciálisan is meglehetősen elkülönülő TmPRX6–ot találták

gombafertőzéstől (*Erysiphe*) függetlenül, a mezofillumban konstitutívan expresszálódónak. A diploid őssel mutatott filogenetikai rokonság ismeretében így – közvetve – feltételezhető, hogy az általunk izolált, TmPRX 1, 2, 3 ill. 6 génnel rokon öt búzafehérje közül az első négy (két lúgos és két savas jellegű) valóban a PR 9 osztály tagja, ez alól csak a TmPRX 6 gén fehérjéjével ortológ búzaprotein lehet kivétel.

Közvetlenül, azaz a homológ búzaszekvenciák szintjén ezidáig csak a TmPRX 3 génnel homológ, jellemzően gyökérben expresszálódó **CAA59485** peroxidáz levélbeni szelektív génexpresszióját tudták patogén-, azaz *Erysiphe graminis* fertőzéssel összefüggésbe hozni, 'Biggar' búzafajtában (Båga *et al.* 1995). Ezzel szemben sem a 'Cheyenne' gyökerében konstitutívan expresszálódó, s szintén a TmPRX3 géntermékével rokon **Q05855** esetében, sem a levélben alacsony szinten kifejeződő, TmPRX1 homológ **CAA59486** búza peroxidáznál nem látták jelét az eddig vizsgált rendszerekben patogén-indukált expressziónak (Hertig *et al.* 1991, Båga *et al.* 1995).

A 'Thatcher'-alapú búzavonalak levélrozsda-fertőzésével asszociáltan kapott eredményeink azonban arra utalnak, hogy e két izolált búza peroxidáz levélbeni kifejeződése is lehet patogénindukált, s így PR9-ként igazolható – de expressziójukban genotípus-függés állhat fenn. Míg ti. a TmPRX3 homológ **Q05855** peroxidázt egyértelműen kimutattuk a Lr9 vonal fertőzött levelének apoplasztjából (12.B ábra/'6'), addig a fogékony 'Thatcher' alapfajta megfelelő mintájában, azonos mérettartományból nekünk sem sikerült igazolni jelenlétét (ld. 12.B ábra/'1**x'** – egy 1,3-1,4glükanáz). A TmPRX1 homológ **CAA59486** búza peroxidáznál is hasonlót tapasztaltunk: fertőzött Lr9-ben igen (12.B ábra/'3'), Lr1-ben viszont (12.A ábra/'1**a,b'**) nem találtuk a fehérje nyomát. A tömegspekrometriailag még nem elemzett kétdimenziós gélek (11. ábra A vs. B) összevetése további támpontot jelenthet a TmPRX1- és a TmPRX2-homológ, savas búza peroxidázok stressszválasszal társítható kifejeződése mellett az Lr9-ben. A fertőzés kapcsán a ~30 kDa-os mérettartomány savas régiójában megjelenő folt-kettősök elhelyezkedése (12. ábra, b/5 és e/5 kvadrátok) ugyanis mind töltés (pI: 4.8 ill. 5.8), mind tömeg (Mr: 28 ill. 30 kDa) szempontjából feltűnő egyezést mutat a két fehérje érett formájánál számított értékekkel. Ezt a feltételezést a jövőben tömegspektrometriás vizsgálatokkal tervezzük igazolni.

Efféle genotípus-függést apoplasztikus peroxidázok expressziós időzítése és erőssége tekintetében Simonetti és mtsai (2009) egészen friss munkájukban is bizonyítottak rezisztens és fogékony búzafajták nematódafertőzésével összefüggésben. Ráadásul a többszáz EST és genomi klón felhasználásával általuk azonosított, s filogenetikai klaszterezéssel 7 eltérő ágba sorolt 20 apoplasztikus búza peroxidáz között a CAA59486 fehérjével közel (96 %-ban) megegyező szekvenciát is azonosítottak, ami ismét csak az izolált és a feltételezett peroxidázok lehetséges eltérését, és az MS-azonosítás adatbázisainak erőteljes hiányosságát bizonyítja.

# Taumatinszerű proteinek (TLP)

A taumatinszerű fehérjék PR5 tagjainak antifungális hatása kórokozó és nem patogén gombák meglehetősen széles körében érvényesül. Több képviselőjük gátló hatását bizonyították in vitro gombák sporulációjában ill. hifanövekedésben, sőt, pl. egyes antrachnózis-rezisztens 'Chardonnay' szőlővonalakban in vivo is (Jayasankar et al. 2003). Egyes tagjaik transzgénikus vagy mutáció alapú túltermeltetése különféle gombafertőzések tüneteinek késleltetését vagy akár megállítását is képes volt előidézni pl. burgonyában (Liu et al. 1994, Zhu et al. 1996), rizsben (Datta et al. 1999) vagy búzában (Duggal et al. 2000, Xing et al. 2008). Gombaellenes hatásmechanizmusuk mikéntjéről mindazonáltal egyelőre még csak feltételezések ismertek. Egyes tagjaik membrán-permeabilizáló aktivitását meghatározott gombafajok növekvő hifáival és csírázó spóraival szemben in vitro úton már több növényfajból, pl. kukoricából (Roberts és Selitrennikoff 1990), dohányból (Abad et al. 1996) vagy lenből (Anzlovar et al. 1998) izolált PR5 fehérjékkel is igazolták. Térszerkezeti jellemzőik és hidegre való érzéketlenségük miatt valószínű, hogy nem klasszikus transzmembránpórusképző fehérjeként hatnak, hanem valamiféle sejtfelszíni gomba membránképlet felismerése útján, közvetett úton vezetnek a membrán permeabilizálódásához (Abad et al. 1996). A PR5 fehérjecsalád a gombasejtfalra is hathat, legalábbis előbb taglalt, bizonyítottan permeabilizáló tagjaik turgort vesztett, plazmolizált sejteken nem tudtak sikert elérni, egyes, előbbiekkel csak részben egyező extracelluláris PR5 fehérjékről pedig az is kiderült, hogy intenzíven kötődnek a legtöbb gomba sejtfalában előforduló, nem vízoldékony lineáris 1,3-béta-D-glükánokhoz, ill. azokkal szemben glükanáz-aktivitást is kifejtenek (Wessels és Sietsma 1981, Trudel et al. 1998, Osmond et al. 1998, 2001 ill. Grenier et al. 1999).

A mintáink proteomikai azonosítása során talált árpa homológok egy részét (TLP7, TLP8) csírázó árpából, *Drechslera teres* patogén gomba fertőzésével asszociáltan publikálták, továbbá az említett, rokon búza TLP izoforma antifungális aktivitását a hópenész, *Microdochium nivale* fertőzés kapcsán írták le őszi búzában (Kuwabara *et al.* 2002). Előbbiekkel való homológia alapján, továbbá a levélrozsda-hausztórium 1,3-béta-glükán tartalmú összetételének ismeretében várható, hogy a Lr9 fertőzött minták apoplasztjából izolált taumatinszerű búzafehérjéink az adott kölcsönhatásban is érdemi antifungális tagjai a PR5 fehérjecsaládnak.

# PR4 fehérjék

A fertőzött Lr9 vonal apoplasztjában azonosított legalább négy, funkcionálisan a PR3 kitinázokkal rokon, de doménszerkezetük alapján a kitin-analógokat gyengén kötő Barwin szupercsaládba sorolt,

fehérje közül a wheatwin-1 és -2 proteinek (másnéven PR 4a, 4b) antifungális hatását *Botrytis cinerea* (szürkepenész) valamint *Fusarium culmorum* ill. *F. graminearum* búzára specifikus 1 és 2 csoportjával szemben Caruso és mtsai már bizonyították (1996). Levélrozsda kapcsán indukálódó expressziójukra azonban ezidáig nem találtunk irodalmi adatot.

# Extracelluláris lipázok

Az extracelluláris növényi lipázok gomba elleni védekezésben gyakorolt szerepéről még nem sokat tudunk. Az általunk Lr9/Tc búzavonalban feltételezett lipáz szekvenciával rokon, szintén GDSLszerű, de Arabidopsis sejttenyészetének felülúszójából izolált (GLIP1-7) és a vizsgálatok alapján etilénfüggő szekretált lipáz-csoportról Oh és mtsai (2005) kimutatták, hogy mind közvetve, mind pedig már a gombaspóra csírázását is gátolva hatékonyan segítik a növényt a nektrotróf típusú, de hiperszenzitív reakciót is kiváltó Alternaria brassicicola fertőzésével szemben. A stressz-indukált lipázok gyenge adatbázis-képviselete miatt különösen örvendetes, hogy épp virulens és avirulens rozsdagombatörzsekre mutatott stresszválasz kapcsán izoláltak nemrégiben egy megváltozott expressziójú GDSL-szerű lipázfehérjét Phaseolus levélből (Lee et al. 2009). A szisztematikus, többszáz fehérjét felvonultató összehasonlító proteomikai analízisben nevezett fehérje kifejeződését, több más proteinhez hasonlóan a bazális és az R gén közvetítette rezisztencia szoros kapcsolatának egyik megnyilvánulásaként értelmezik, lehetséges szerepüket pedig az oxidatívan stresszelt membránból esetlegesen kihasított, zsírsav-alapú szignálok képzésével hozzák összefüggésbe. További jó hír, hogy egy egészen frissen publikált, épp levélrozsda-fertőzött Lr9/Tcbúzavonalra specifikus SSH cDNS-könyvtár közel száz patogenezis-indukált és eddig szekvenált klónja között egy lipáz szintén szerepel (Lasota *et al.* 2009).

S, noha lipázok mikrobiális szervezetekből való szekréciója közismert és pl. egyes patogén gombák támadásában stratégiai szerepet is tulajdonítanak nekik, kevéssé ismert tény, hogy 1983-ban egy extracelluláris lipázokkal szemben hatékony, mikrobiális eredetű lipáz inhibitort is kimutattak a kórokozó *Rhizopus microsporus* micéliumából (Davranov *et al.* 1983).

# **RuBisCO**

A levélrozsda-fertőzés kapcsán megnövekedett intenzitású fehérjefoltjaink némelyike egyértelműen RuBisCO enzimhez volt köthető, melynek stresszhez kapcsolódó anyagcsere-változásáról már ismertek adatok, azonban az, hogy ez összefügghet-e a fehérje (fragmentumainak) apoplasztban való megjelenésével, egyelőre nem tisztázott.

Ha, lévén szó biotróf patogénekről, eltekintünk a gyengülő membránintegritás lehetőségétől, és pusztán a parazitáló patogének révén megjelenő "zöld szigetekre" koncentrálunk (Király, 2008), elképzelhető, hogy a levélrozsda-fertőzés kapcsán is az előbbi képletekben érvényesülő citokinin túlsúly tehető felelőssé a RuBisCO fehérje (szennyeződésként az ICF-ben is követhető), megnövekedett expressziójáért, amint azt *Plasmodiophora brassicae* fertőzött *Arabidopsis* kapcsán Devos és mtsai (2006) bizonyították. Egy másik hormoncsoport, a gibberellinek RuBisCO mennyiségére gyakorolt pozitív hatását túltermelő transzgénikus citrusfélékben transzkripciós szinten (Huerta *et al.* 2008), szójában pedig fehérje szinten (Yuan és Xu 2001) igazolták. A sporuláló képletek kapcsán idővel sérülő membránintegritás vagy megnövekvő érzékenység pedig a későbbiekben csak kiegészítheti az ICF-növekményt.

# M1.2 A kadmiummal kezelt árpában azonosított apoplasztfehérjék

A kadmium-stresszelt árpa (H. vulgare cv. 'Mandolina') apoplasztjának proteomikai analízise a 10-40 kDa régióban általában koncentrációnövekedést mutatott ki, csak némely esetben mutatkozott csökkenésre utaló festődés. Mivel a pillanatfelvétel jellegű gél-alapú proteomikai profilezés csak a fehérjék mennyiségének változását detektálja, nem hivatott és első közelítésben nem is képes annak eldöntésére, hogy az MS-azonosított fehérjék intenzitásában megfigyelt különbségek miből eredeztethetők. A változások egyaránt adódhatnak az expresszió transzkripciós vagy transzlációs szintű szabályzásából vagy a fehérje turn-over változásából, de éppúgy a sejtes transzportfolyamatok ill. a szekréció befolyásolásából. Utóbbihoz az extracelluláris fehérjék kijutását is befolyásolni képes sejtfalszerkezet módosulásai is hozzájárulhatnak. A poszttranszlációs módosítások hatását szintén nem zárhatjuk ki. Emiatt, a változások pontos hátterének és jellegének azonosítására, valamint a funkció feltérképezésére a jövőben célszerű további fehérje szintű vizsgálatokat (pl. szerológiai / aktivitás assayek) és transzkripciós analíziseket (promóter-analízis, RT-qPCR) is beyonni.

A kadmium-stressz kapcsán növekvő intenzitást mutató, proteomikailag azonosított fehérjék lehetséges szerepét szekvenciális rokonságuk és vélhető funkcionális hasonlóságuk szerinti tárgyaljuk. Mivel azonosított fehérjéink többsége, de legalábbis homológjaik a pathogenesis-related (PR) családok valamelyikébe sorolható, a PR családok számozása adja a sorrendiséget.

# PR1 fehérjék

A PR1 fehérjék abiotikus stresszekkel összefüggésben vállalt szerepe kapcsán tudásunk, ha lehet, még gyérebb, mint a biotikus stresszorok kapcsán. Az általunk is azonosított, két közel rokon, bázikus, intercelluláris PR1 fehérjét (PRB1-3 és HV-1a) eredetileg szintén árpában, lisztharmatfertőzéssel (*Erysiphe graminis*) asszociáltan írták le, különböző hiperszenzitív reakciót mutató, ellenálló és fogékony fajtákban ill. közel izogén vonalakban (Bryngelsson *et al.* 1994, Mouradov *et al.* 1994).

Bár a két, konkrét PR1 fehérje kadmium-stresszben gyakorolt szerepéről, sőt, egyáltalán részvételükről sincsenek korábbi információink, Sarowar és mtsai (2005) egy paprika eredetű, szintén bázikus PR1 gén (CABPR1) dohányban való, erőteljes traszgénikus kifejeztetésével próbáltak a csoport feltételezhetően összetett funkciója nyomába eredni. Azt tapasztalták, hogy a transzgénikus dohánynövény nemcsak Oomycota (Phytophthora nicotianae) és bakteriális támadásokkal szemben (Ralstonia solanacearum, Pseudomonas syringae pv. Tabaci) mutatkozott ellenállóbbnak, de nehézfém-stresszre (Cd és Hg) is toleranciát mutatott csíranövénykori és kifejlett állapotában egyaránt, amennyiben például levélfelületi visszamaradottság és gyökérfejlődési anomáliák (oldalgyökér- és gyökérszőrképződés terén) a kezelt nem transzgénikus növényekkel szemben esetükben nem jelentkeztek. Az expressziós hangolások finomságát és összetettségét jól jellemzi, hogy a beépített PR1 forma expressziós növekedésével párhuzamosan, RT-PCR-rel egy savas kitináz gén (PR-Q) és egy, az oxidatív stressz gyengítését és elektrofil konjugátumokat méregtelenítő glutation-S-transzferáz expressziójában szintén növekedést tapasztaltak, viszont egy másik PR1 (PR-1a), valamint a taumatin gén (PR5) kifejeződésében, továbbá az aszkorbátperoxidázok expressziójában kifejezett gyengülés volt tapasztalható. A CABPR1 túltermeltetése kapcsán kialakuló, általános peroxidáz aktivitásban is megfigyelhető csökkenés különösen abból a szempontból érdekes, hogy az említett enzimek az oxidatív stressz leküzdésében, s a reaktív szabadgyökök semlegesítésében jelentős szerepet vállalnak. Mindez arra utalhat, hogy nemcsak pl. a nehézfémstressz, hanem a nevezett PR1 fehérje dohánysejtekben való, heterológ kifejeztetése ill. túltermelése is felboríthatja a redox-rendszert, amely viszont, a hidrogén-peroxid felgyűlése révén szintén maga után vonhatja a biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni védettséget – tolerancia kialakulása formájában.

# PR2 fehérjék

A kadmium jelenléte kapcsán általunk azonosított endo-1,3-glükanázok NCBI adatlapjain nem találhatóak olyan információk, amelyek arra utalnának, hogy a leírt proteinek stresszelt növényi izolátumokból származtak. A glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII fehérje prekurzort több

egészséges, csírázó fiatal árpafajtában is leírták már (Ballance és Svendsen 1988, Høj *et al.* 1989), s gombanövekedést gátló aktivitását később *in vitro* assayben igazolták (Leah *et al.* 1991). Transzkriptuma normál élettani körülmények közt a mag érése során csak kis mértékben akkumulálódik, majd a csírázást követően fejeződik ki nagyobb mennyiségben az aleuronban és a csíranövény differenciálódó szöveteiben (Leah *et al.* 1991), ahol a raktározott szénhidrátok mobilizálásában és a preformált védekezésben is segédkezhet.

Bár azonosított béta-1,3-glükozidázunk funkciója a nehézfém-stressz kapcsán egyelőre nem ismert, elképzelhető, hogy a kadmium-stressz folyamán másodlagosan fellépő dehidratáció (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002) leküzdésében, pl. glüko-hormon konjugátumok hasításával, főként a glikozilált abszcizinsav-formák felszabadításában és aktivitásának szabályzásában vagy más módon is segédkeznek az apoplasztban (Leubner-Metzger és Meins 1999). Ez a béta-glükozidázok több abiotikus stresszben is feltételezett szerepét tovább erősítené. Az erre utaló közvetett bizonyítékok az alábbiak:

Az újabban biotikus fertőzésekkel is kapcsolatba hozott, de alapvetően dehidratációs és ozmotikus stresszben (pl. só, szárazság, fagy) kulcsszerepet játszó abszcizinsav aktív *pool*jának szabályzása és szervek közti, hosszútávú transzportja többek közt glükohormon-konjugátumok formájában megy végbe (Minic 2008, Jiang és Hartung 2008). Az inaktív konjugátumok vizsgálata során Dietz és mtsai (2000) árpában azt találták, hogy a gyökérkéregből származó, szerkezetileg még csak hiányosan ismert ABA-glükozidok közül sókezelés hatására különösen a glükóz-észterek (ABA-GE) dúsulnak fel a xilemnedvben (Sauter et al. 2002, Hartung és Jeschke 1999). Mennyiségük és szabad ABA hormonhoz képesti arányuk azonban a sejtközötti állományba jutva drasztikusan lecsökken, mégpedig épp bizonyos szekretált glükanázok hétszeres mennyiségi növekedésével egyidejűleg. Dietz munkacsoportja egy ABA-glükozidokra specifikus enzimfrakciót is megkülönböztetett a sókezelés kapcsán szekretált glükanázok különböző hormon-glikozidokkal végzett kompetitív aktivitásmérése során. Lee és mtsai (2006) egy citoplazmatikus, nagymolekulatömegű glükozidáz (AtBG1) közvetlen szerepét bizonyították az ABA mikroszómákból való felszabadulásában, s AtBG1-deficiens Arabidopsis-ban egyebek között kiemelt abiotikus stressz-érzékenységet, míg az enzim ektópiás kifejeztetése után széleskörű abiotikus stressz-toleranciát figyeltek meg. A citoplazmából izolált AtBG1 enzim szekréciója in vivo ugyanakkor egyelőre nem bizonyított, így emiatt is feltételezhető, hogy egyéb, kis molekulatömegű glükozidázok szintén szerepet játszanak az extracelluláris ABA frakció aktiválásában (Jiang és Hartung 2008). Ugyan az ABA-glükozidok hasításáért egyelőre elsősorban a glüko-hidrolázok I. családját teszik felelőssé (Minic 2008), mindaddig azonban, amíg az ABAglükozidokat alkotó konkrét cukorpartnerek, a meghatározó kötéstípusok ill. diverzitásváltozásaik hátterében álló okok feltárásában nem lesz érdemi előrelépés, izolált enzim-szubsztrát komplexek hiányában a bizonyítottan indukálódó egyéb glükanázok (s így az azonosított 17. glüko-hidroláz családba sorolt endo-1,3-glükanázok) szerepét sem zárhatjuk ki az előbbi folyamatokban.

Ráadásul az apoplaszt- ill. xilemnedv dehidratációval járó stresszfolyamatokban is jellemző ellúgosodása (Wilkinson és Davies 1997, Wilkinson 1999, Sauter *et al.* 2002) nemcsak az ABA xilembe vándorlását segíti elő anioncsapdaként (Slovik *et al.* 1995), hanem a stabil, hosszú távú szignálként viselkedő ABA-GE (Hartung és Jeschke 1999) hasításában érintett glükozidázok apoplasztikus hányada számára is előnyös működési körülményeket biztosít, azok közel semleges pH optimuma miatt (Hartung *et al.* 2002). Így az ABA szervezeten belüli felszabadulása, szétterjedése és célszervekhez (pl. sztómákhoz) juttatása stresszhelyzetben különösen sikeressé válik (Sauter *et al.* 2001, Davies *et al.* 2002).

Eltérő érzékenységú búzafajtákon végzett szárítási kísérletek ugyanakkor esélyessé teszik egyes szekretált búza 1,3-1,4- $\beta$ - és 1,3- $\beta$ -glükanázok más jellegű, de egyelőre ismeretlen módú szerepvállalását is a dehidratáltság leküzdésében. Konno és mtsai (2008) ezen enzimek szárazságérzékeny fajtában mutatkozó drasztikus indukciója mellett, a szárítás kapcsán egyes sejtfal-poliszacharid összetevők arányának jellemző változását is tapasztalták, amely a toleráns és az érzékeny genotípusban eltérő jellegűnek mutatkozott.

#### PR3 fehérjék

A kadmium-stressz kapcsán általunk azonosított két rokon, savas és bázikus kitináz eredetileg szintén *Erysiphe graminis* fertőzéssel asszociáltan jelent meg az NCBI adatbázisban, épp a PR1 fehérjék kapcsán már említett dán munkacsoport, Bryngelsson és más munkatársai jóvoltából. Kadmium-mérgezéssel közvetlen összefüggésben álló, specifikus feladatkörükről azonban egyelőre nincsen tudomásunk. Kitinázok aktivitásának érdemi növekedését kadmium-stresszelt árpában előbb Metwally és mtsai (2003), majd finomabb felbontásban Békésiová és mtsai (2008) is dokumentálták. Utóbbi munkacsoport, nehézfémekkel kezelt két- és egyszikűekben (bab, szójabab és borsó, továbbá árpa és kukorica) végzett kitináz-assay-eik részeként, négy, eltérő mérettartományba eső (35, 31, 27 és 21 kDa) izoforma-csoportot is elkülönítettek árpa gyökerében, amelyből (a 31 kDa-s típus kivételével) az összes forma indukálódott a tesztelt nehézfémekre (Pb, As és Cd). A kivonatban két savas/semleges forma növekvő szerepét aktivitás szinten is sikerült igazolniuk. Mindez, saját eredményünk támogatása szempontjából annál is értékesebb, mivel az árpa NCBI fehérje adatbázisában 2009-ben fellelhető közel 40 kitináz linkből mindössze négy hordozott 26 kDa-s méretű szekvenciát. A publikáció fontosságát jelzi továbbá, hogy több fajban is

elsőként dokumentálták egyes kitináz izoformák egy-egy fémionra más nehézfémekénél jellemzőbb, specifikus felgyülemlését. Hasonlóan, de  $HgCl_2$  kezelés, UV sugárzás és egy vírusfertőzés (A1MV) hatásának összevetésével Margis-Pinhero és mtsai (1993) már kimutattak nehézfémre ( $Hg^{2+}$ ) specifikusabban vagy legalábbis más időkinetikával indukálódó kitináz izoformát bab növényben.

A kitinázok szekvenciális azonosítása ugyanakkor nehézfémstresszek esetében sem elhanyagolható. Az igényt jól mutatja, hogy míg a legtöbb eddig vizsgált növényfajban (így kukoricában, borsóban, napraforgóban, árpában vagy babban) fehérje és transzkripciós szinten egyaránt a nehézfémek ill. metalloidok (pl. Mn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) kitináz akkumulációt indukáló ill. expressziójukat növelő hatását detektálják (Nasser *et al.* 1988, Jung *et al.* 1995, Metwally *et al.* 2005 illetve Didierjean *et al.* 1996, Wu *et al.* 1994, Rivera-Becerril *et al.* 2005a,b), más esetben (pl. káposztában) viszont beszámoltak már az Ag<sup>+</sup> és Cd<sup>2+</sup> kitinázaktivitást gátló hatásáról is (Chang *et al.* 1992).

A kitinázok lehetséges szerepe mindazonáltal a mai napig nem tisztázott a nehézfémstressz elleni védekezésben, annak ellenére, hogy pár éve egy gomba eredetű kitinázokat expresszáló, heterológ dohányban több biotikus és abiotikus stresszel (köztük kadmiummal és rézzel) szemben is fokozott ellenállóképességet bizonyítottak (Dana *et al.* 2006).

# PR4 fehérjék

A kitin-kötő, ill. kitináz aktivitású, a PR3 csoporttal szekvenciálisan nem rokonítható Barwin fehérje ill. pathogenesis-related 4 protein kapcsán sem ismert nehézfém-stresszel közvetlen összefüggést mutató funkció. Előbbi fehérjét eredetileg sebzéshez, míg utóbbit *Erysiphe graminis* fertőzéshet köthetően írták le, gyenge kitinkötő ill. potenciális lektin aktivitással (Gregersen *et al.* 1997, Svensson *et al.* 1992). A család egyes képviselőinek nehézfém-érzékenységét ugyanakkor megerősíti, hogy egy szintén PR4-típusú, ~20 kDa-s fehérjét, a CBP20 proteint Cd- ill. Zn-kezeléssel is sikerült már fiatal dohánylevélben indukálni a szalicilsavra vagy sebzésre adott válaszhoz mérhető intenzitással (Hensel *et al.* 1999).

# PR5 fehérjék

A névadó nyugat-afrikai cserjében, a *Thaumatococcus daniellii*-ben leírt, intenzíven édes taumatinokkal (Van der Wel és Loeve 1972) szekvenciálisan homológ, de szerkezetileg meglehetősen diverz csoportot alkotó, időközben állatokban is azonosított taumatinszerű fehérjék (TLP-k) a PR5 fehérjecsalád képviselőiként közismertek (5. táblázat). Részt vehetnek az abiotikus stresszválaszban is, pl. dohányban, fokozatos sózás hatására ill. abszcizinsavra ozmotin felgyülemlését tapasztalták (Singh *et al.* 1989), de konkrét hatásmechanizmusukról, amely

vélhetően igen szerteágazó, máig nem sokat tudunk. Szekvenciális alapon az emésztést gátló, alfaamiláz inhibitorok egy ágát (Franco et al. 2002), valamint a normál anyagcserében és számos stresszfolyamatban is közreműködő glutation-S-transzferáz szupercsalád számos tagját is gyakran a taumatinszerű fehérjék közé sorolják (Rebmann et al. 1991a, Mauch és Dudler 1993, Marrs 1996). Arról, hogy az általunk is azonosított, szekretált taumatinszerű fehérjék (Barperm1, TLP7, TLP8 ill. antifungal protein R), melyeket eredetileg csírázó árpából, Drechslera teres patogén gomba fertőzésével asszociáltan ill. Trichoderma viridae és Candida albicans gombák növekedését gátló, antifungális szerepkörben írtak le (Reiss és Horstmann 2001, Hejgaard et al. 1991), miként vehetnek részt az árpa kadmium-kezelésére adott stresszválaszában, csupán a szekvenciákra alapozva előbbiek miatt nehéz nyilatkozni. Egyrészt elképzelhető, hogy ténylegesen abiotikus stresszre specializálódott, s a nehézfémek konjugálásában akár közvetlenül hatékony, TLP izoformák indukcióját tapasztaljuk, melyek funkcionálisan is különbözhetnek a biotikus válaszban, ill. a normál anyagcsere-folyamatokban közreműködők formáktól. Ennek lehetőségét Mauch és Dudler (1993), egyes búza GST-izoformák eltérő kereszthibridizációs foka, szerológiai jellemzői, indukálhatósága és szubsztrát-specificitása szintjén már több mint 15 éve felvetették. Sappl és mtsai (2004), széleskörű fehérje-expressziós vizsgálatokat végezve eltérő szalicilsav-indukálhatóságot mutattak ki a GST-szupercsalád növényspecifikus és szekvenciális alapon elkülönülő (phi és tau) osztályai között. A specifikus indukálhatóság mélyebb fokát jól jellemzi, hogy az Arabidopsis-ban eddig ismert, több mint félszáz GST-ből, Sarry és mtsai (2006) sejtkultúrában, valamint Roth és mtsai (2006) gyökér proteomájában kadmium hatására épp azt a két ill. három, amúgy *phi* osztályba tartozó GST-t azonosították transzkripciós illetve proteomikai úton, amelyeket pár évvel korábban  $Cu^{2+}$  kezelés kapcsán is leírtak a csíranövény szintjén (Smith *et al.* 2004).

A különböző sejtes térrészekben lokalizált, a citoszól mellett peroxiszómából, sejtmagból, apoplasztból is izolált GST-k (Flury *et al.* 1996, Edwards és Dixon 2005, Dixon *et al.* 2009) szerteágazó, s szekvenciából egyelőre nehezen becsülhető szubsztrát-specificitása mögött többféle mechanizmus állhat. Marrs és Walbot (1997), kukoricában egy kifejezetten kadmiumstresszre érzékeny, 5' alternatív transzkripciós starthelyet azonosított az ún. *Bronze2* GST génnél, amely normál körülmények közt az antocián-bioszintézis utolsó lépcsőfokát katalizálja és konjugátumainak vakuólumba juttatását készíti elő. A normál transzkriptumnál ~200 bp-ral hosszabb, extrém hatékonysággal átíródó és jelentős mennyiségben felgyűlő, de egyéb kezelésekre nem érzékeny mRNS alapján egy nehézfém-stresszre specifikus, egyelőre ismeretlen funkciójú, s az eredeti GST-aktivitást (az antocián-konjugálást) nem mutató fehérjeváltozat jelenlétét valószínűsítik. Emellett alternatív RNS-érési folyamatoknak, illetve különösen a foszforiláltság

szintjén mutatkozó, poszttranszlációs módosulásoknak és az alegységek kombinálódásának is lehet szerepe egy adott GST funkciójának meghatározásában (Sappl *et al.* 2004, Moons 2005).

A nehézfém-specifikus, intercelluláris TLP-k funkciójának tisztázása egyelőre nehézkesen halad. Tehénborsó mangán-mérgezésre adott szekréciós válasza során Fecht-Christoffers és mtsai (2003) egyebek mellett egy olyan, taumatinszerű fehérjékkel homológ, apoplasztikus fehérjét azonosítottak, amely (gvajakol-)peroxidáz aktivitást mutatott. Ez az információ azonban nyilvánvalóan nem elegendő a konkrét funkcionális jellemzéshez. Az *Oryza* genomjának ismeretében, illetve a géntechnológia, valamint a szélesebb értelemben vett proteomikai technológiák fejlődésével azonban mára adott volna a lehetőség, hogy a rizs Cu<sup>2+</sup>- illetve Cd<sup>2+</sup>- stressze kapcsán korábban azonosított taumatinszerű fehérjék ill. glutation-transzferázok (Rakwal *et al.* 1999, Hajduch *et al.* 2001) lokalizációját egyértelműen bizonyítsuk és esetleges partnereiket is feltérképezzük, akár tag-elt fúziós proteinek vagy natív *in vitro / in vivo* interakciós rendszerek alkalmazásával. Feltétlenül mérlegelendő, hogy apoplasztikus TLP indukciónk hátterében nemcsak egy kadmium-indukált, a nehézfémekre specifikus reakció állhat, hanem a Cd-által kiváltott szélesebb és általánosabb jellegű oxidatív stresszválasz is. Ekkor a szekretált TLP fehérjék pl. antioxidánsként vagy más módon is hasznosulhatnak.

# PR17 (ill. BSP) fehérjék

A korábban bázikus jellegű szekréciós proteineknek (BSP) titulált fehérjéket, WAS 1-12 néven eredetileg abszcizinsav indukcióval összefüggésben, búza sejtszuszpenzióból izolálták Kuwabara és mtsai (1999). A növényi védekezésben szereplő, de meglehetősen szerteágazó eredetű fehérjék közt voltak taumatinszerűek (pl. WAS3), de olyan szekvenciák is (pl. WAS2), amelyek egy, benzothiadiazol (BTH) indukálta SAR-ral összefüggésben indukálódó fehérjével (pl. WCI-5) mutattak közelebbi rokonságot. Ezt az utóbbi csoportot a későbbiekben PR17 család néven illették, amely idővel több rokon fehérjével bővült. Ide tartozik elsőként pl. a dohány NtPRp267 (Okushima *et al.* 2000), a búza WCI-5 (Görlach *et al.* 1996), és az árpa HvPR-17a,b ill. c (Christensen *et al.* 2002). Utóbbiakat szintén *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (lisztharmat) fertőzés kapcsán, és a gombainvázió által érintett epidermiszben valamint a mezofillum apoplasztjába szekretáltan izolálták. A PR17 fehérjék antimikrobiális hatásának hátterében egyesek proteináz aktivitást feltételeznek, mert a család egy jelentős, konzervatív köre egy eukarióta exopeptidáz (az aminopeptidáz N), valamint egy bakteriális endopeptidáz (a termolizin) aktív helyével és peptidkötő árkával mutat szembetűnő hasonlóságot (Christensen *et al.* 2002). Nehézfém-stresszben betöltött szerepükről, vagy legalábbis megjelenésükről egyelőre nincsenek adataink.

# **RuBisCO**

Az árpa kadmium-stressze esetében a vizsgált, csökkent intenzitású apoplaszt-fehérjefoltokat RuBisCO-val társította az MS-analízisünk. A RuBisCO alegységeinek negatív szabályzása több szinten is megvalósul olyan stresszek esetében, amelyek jazmonát (JA) közvetítette jelátviteli útvonalakat is érintenek: az eddigi eredmények alapján megváltozott transzkripciós reguláció (putatív G-box motívum ill. egy alternatív, hosszabb, hibás mRNS-variáns révén), ko- és poszttranszlációs változások , valamint csökkent aktiváció és intenzívebb lebontás is fennállhat (Reinbothe *et al.* 1994). Abszcizinsav és szárazságstressz is a jazmonsav okozta válaszhoz hasonló repressziót okozott (Reinbothe *et al.* 1992, Vu *et al.* 1999). Több jel utal arra ugyanakkor, hogy az öregedés és az oxidatív stressz kapcsán korábban leírt RuBisCO degradáció (Makino *et al.* 1984, Desimone *et al.* 1996, Ishida *et al.* 1997, 1999) számos abiotikus stresszben, pl. erős fény, hideg, szárazság, elárasztás kapcsán is megfigyelhető (Nakano *et al.* 2006, Ali és Komatsu 2006, Ahsan *et al.* 2007a) sőt, végeredményben károsító hatásaik jórésze is épp az oxidatív károsodásra, ill. ezzel összefüggésben a programozott sejthalálra vezethető vissza (Coffeen és Wolpert 2004, Ahsan *et al.* 2007a,b).

Egy nektrotróf gomba (*Cochliobolus victoriae*) toxinja, a victorin hatására Navarre és Wolpert (1999) olyan programozott sejthalál-típust írt le a fertőzésre érzékeny zab növényben, amely a RuBisCO specifikus proteolízisét indukálja. Zabban Casano és mtsai (1994) fény- és oxidatív stressz kapcsán már korábban publikálták egy RuBisCO-ra specifikus proteázt indukcióját a kloroplasztiszban. A Coffeen és Wolpert (2004) által detektált, victorin-kezelés vagy hő hatására is nagy gyorsasággal az apoplasztba kiválasztott kaszpáz-szerű szerin-proteázok (szaszpázok) esetében azonban egy merőben más hatásmechanizmusról van szó: a szaszpázok nem közvetlenül felelősek a RuBisCO későbbi proteolíziséért, inkább processzáló szerepet töltenek be a több lépcsős, számos proteáz részvételével zajló jelátvitel kezdeti fázisában. Curtis és Wolpert (2004) azt is bizonyították, hogy a gazdanövény sejtmembránjának szerkezeti érintetlensége még ebben a nekrotróf viszonyban is fennáll a RuBisCO proteolízisekor, majd a kondenzálódott, magi DNS létraszerű fragmentációjakor, egészen a sejt összeesésének megkezdődéséig, így a szaszpázok ICF-ben való korai megjelenése még korántsem a sejtlízisnek, inkább irányított transzportnak köszönhető.

Mivel pedig jelenleg egyre több bizonyíték gyűlik arra nézve, hogy a kadmiumstressz maga is képes egy oxidatív jellegű, de kaszpáz-szerű proteinek részvételével zajló, programozott sejthalált indukálni (Iakimova *et al.* 2005, 2006), így elképzelhető, hogy a nehézfém jelenlétével asszociált apoptotikus folyamatban szintén az előbb taglaltakhoz hasonló módon ill. ütemezéssel zajlik a RuBisCO fragmentációja és a membránintegritás változása.

Összefoglalóan tehát megállapíthatjuk, hogy a szakirodalomban leírt eredmények eddig nem tártak fel olyan mechanizmusokat, amelyek a RuBisCO intercellulárisokba való kijutását *in vivo* bizonyítottan lehetővé tennék. Ezért feltételezzük, hogy e fehérje az intercelluláris folyadékban továbbra is izolálási műtermékként jelenik meg. Az ICF-ben detektálható mennyiségi változások hátterében így valószínűleg (elsőrendűen és közvetlenül) a sejtfal- és a membránszerkezetek megváltozása és következésképp eltérő sérülékenysége állhat. Az extracelluláris térbe jutó fragmentumok ugyanakkor forrásuk, azaz az adott stressztípus kapcsán potenciálisan szintén változó sejten belüli RuBisCO-*pool* aktuális állapotának lenyomataként is szolgálhatnak.

# M1.3 Egészséges búza csíranövényben azonosított apoplasztfehérjék

#### A növényi sejtfal poliszacharidok bontását végző, endogén hidrolitikus enzimek

Alfa-L-arabino(furanozid)áz és béta-D-xilano(piranozid)áz aktivitású proteinek különféle izoformáit Holden és Rohringer már 1985-ben azonosították búzában, egészséges, Little Club fajta apoplasztjának 2D-térképezése során, *in gel* (ill. *on blot*) aktivitás assay révén, s pozicionális egyezések miatt már akkor felmerült, hogy kettős aktivitású képviselőik is létezhetnek - az MS-analízisre akkoriban azonban még nem volt lehetőség.

Az általunk [B] foltból izolált búzafehérje (30. ábra) adatbázisban nem szereplő volta miatt árpában, homológként azonosított bifunkcionális ARA-I transzkriptumáról Lee és mtsai (2003) később kimutatták, hogy leginkább fiatal levélben és gyökérben, továbbá fejlődő szemtermésben dominál. Egy szintén kettős funkciójú, retek éretlen magjából izolált ARA-I homológról pedig azt is sikerült bizonyítani (Kotake *et al.* 2006), hogy az arabinogalaktán-proteinek (AGP) szénhidrát-tartalmának átalakításában segédkezik.

A növényi sejtfal poliszacharidok bontását végző endogén hidrolitikus enzimek kutatása mikrobiális homológjaikhoz képest meglehetős késéssel indult meg (Matheson és Saini 1977). A normál sejt növekedésében, általánosságban a sejtfal újramodellezésében és megnyúlásában segédkeznek, legtöbb esetben szinergista kölcsönhatásban, de akár annak drasztikus lebontásában is képesek közreműködni a magcsírázás folyamán (Hirano *et al.* 1994, Saha 2000, Dornez *et al.* 2009).

Az (arabino)xilánok átalakítását végző enzimeknek különösen a fűfélékre jellemző, pektinszegény és csekély xiloglukán tartalmú ún. II. típusú elsődleges sejtfalszerkezet átalakításában van nagy jelentőségük, hiszen esetükben pektinek és a kevert kötésű  $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)-\beta$ -D-glukánok (MLG)

mellett ez képezi a hemicellulóz túlnyomó hányadát (Carpita 1996, Fincher 2009). Hatásmechanizmusukat a 36.A ábrán szemléltetjük.



**36. ábra:** Az egészséges búza (cv. Chinese Spring) csíranövény apoplasztjában azonosított növényi sejtfal módosító enzimtípusok hatásmechanizmusa (az azonosított enzimek keretben kiemelve).

A) A fűfélékre jellemző, ún. II. típusú elsődleges sejtfal hemicellulóz frakciójának fő komponensét alkotó (glükurono)arabinoxilánok – (G)AX – szerkezete és a degradációjukban közreműködő hidrolitikus enzimek támadáspontjai. Az AX gerincét β-(1,4)-kötésű xilózok homopolimer láncolata adja, amelyek oldalláncként a C(O)-2 és/vagy C(O)-3 pozícióban arabinózzal egészülhetnek ki, az arabinózokat pedig C(O)-5 szénatomjukon a ferulasav észteresítheti, amely oxidatív dimerizálódás révén egyéb AX láncokkal vagy éppen ligninnel is keresztkötést alakíthat ki. (Továbbá – az ábrán nem jelölt módon – a xilán váz C(0)-2-atomjain α-D-glükuronsav vagy 4-O-metilésztere is lehet szubsztituens  $\rightarrow$  innen a GAX elnevezés, valamint szintén gyakori a xilozil OH-maradékok acetilálódása). Az endo-β-(1,4)-D-xilanázok (EC 3.2.1.8) a xilán gerinc belsejében bontanak, míg a β-D-xilozidázok (EC 3.2.1.37) a kisebb xilo-oligoszacharidok nem redukáló végéről (a kötések C(0)-4 vége felől) hasítanak le xilóz monomereket. Az α-L-arabinofuranozidázok (EC 3.2.1.55) az arabinóz szubsztituenseket távolják el a xilán vázról, a ferulát-észterázok (EC 3.1.1.73) pedig utóbbiról szabadítanak fel ferulasavat. (Az ábrán nem jelölt glükuronsavat α-glükuronidázok (EC 3.2.1), az OAc-csoportokat pedig acetil(-xilán)-észterázok (EC 3.1.1.6) képesek lehasítani a xilán-vázról).

(*Forrás*: http://www.challenge.com.cn/english/uploadfile/200710/2006124111740722.jpg, továbbá Srinivasan és Rele 1999 ill. Dornez *et al.* 2009 nyomán, módosítva).

**B**). β-D-galaktozidázok (EC 3.2.1.23) lehetséges szerepe a növényi jelátvitelben. A galaktozidázok, többek közt exo- és/vagy endogén arabinofuranozidázok szinergista közreműködésével részlegesen hasítják a növényi sejtfalban esszenciális szerepű arabinogalaktán proteinek (AGP) cukorkomponenseit, termékeik pedig endogén elicitorként működve az intracelluláris jelátvitelt serkenthetik a növény számos normál ill. kórélettani folyamatában.

(Forrás: Showalter 2001 nyomán, módosítva)

A [C1] folt (30. ábra) MS-azonosítása egyértelműen **béta-galaktozidáz** jelenlétére utalt, de búzában nem találtunk homológot. A növényi szövetek **béta-galaktozidáz**ai sejtes előfordulásuk szerint sokfélék lehetnek: aktivitásukat kloroplasztiszban (Bhalla és Dalling 1984), proteintestekben (Corchete és Guerra 1987), vakuólumban (Nakamura *et al.* 1984) is kimutatták, de szekretált formáik is ismertek. A sejtfalból pl. Pierrot és Van Wielink (1977) ill. Corchete és Guerra (1987), az intercelluláris folyadékból Holden és Rohringer előbb említett munkájukban további,

sejtfal hasító glükozidázokkal együtt mutatta ki több, nem glükoprotein izofomájukat (1985), Sekimata és mtsai pedig csíranövényben *in situ* is bizonyította gyakori extracelluláris lokalizációjukat (1989). A leváló gyökérsüveg-sejtekhez köthető, rhizoszférába szekretált formáik iránti érdeklődés kezd ismét megerősödni (Wen *et al.* 2007, 2008).

A hasított kötéstípus szerint (pl. béta-2, -4, -3, -6) eltérő specificitással rendelkezhetnek, mely eltérő hatásmechanizmusuk és lokalizációjuk révén betöltött funkcióikat is befolyásolja. Lehetséges szerepük igen sokféle lehet. Egy, különböző *Arabidopsis* szövettípusokban végzett szisztematikus,  $\alpha$ -fukozidáz,  $\alpha$ -xilozidáz,  $\beta$ -galaktozidáz és  $\beta$ -glükozidáz génexpressziós vizsgálat alapján feltételezik, hogy a sejtfali xiloglukán oligoszacharid-típusok szövetek közti, ill. fejlődési állapotnak megfelelő eltérő megoszlásáért jelentős mértékben épp a négyféle glüko-hidroláz típus eltérő expressziója lehet a felelős (Iglesias *et al.* 2005).

A béta-galaktozidázok preformált védekezésben felmerült szerepét több analízis is támogatja. Sekimata munkacsoportjában (1989), retek csírázó magjából egy olyan, a - leginkább savas vagy semleges - növényi galaktozidázok körében ritka, bázikus béta-galaktozidázt izoláltak, amely az apoplaszt közegében ideális, pH 4-es optimumot mutat és az általunk izolált búza galaktozidázzal méret és töltés alapján kifejezetten rokonítható (MW: 45 kDa denaturált körülmények közt, vs. 60 kDa gélszűréssel; pI: 8.6-8.8). Az enzim exohidroláz típusú, és szigorú szubsztrát-specificitása révén (kizárólag  $\beta$ -1,3- és  $\beta$ -1,6-D-galaktozil maradékok) a sejtfal arabinogalaktán-proteinek (AGP) vázára specifikált lehet. Az enzim és szubsztrátjának kolokalizációját ugyan bizonyították, in vivo aktivitásmérések azonban még nem állnak rendelkezésre. Működésében azonban érdekességnek tekinthető, hogy az izolált, magi és levél eredetű AGP-k normál körülmények közt mindaddig ellenállóak voltak hatásával szemben, mígnem *gomba* eredetű alfa-L-arabinofuranozidázok közreműködése révén hozzáférhetővé nem váltak nem-redukáló végük felől, ahol korábban a 3-Dgalaktozil-csoportok az oldalláncokon alfa-L-arabinofuranozil oldalláncokkal voltak elfedve. Az ennek köszönhető, részleges AGP degradálódás fő terméke, a D-galaktóz mellett pl. uronsavat, Larabinózt és egyéb, kisebb oligoszacharidokat is detektáltak, amelyek mint endogén elicitorok a védekezés beindításában alapvető szerepet játszhatnak (36.B ábra; Hirano et al. 1994, Etzler 1998, Showalter 2001, Hawes et al. 2007). Béta-galaktozidázok hasonló, de az AGP-k szénhidrát komponenseit saját arabinofuranozidázokkal közreműködésben hidrolizáló aktivitása pl. spenótban már közel másfél évtizede ismert (Hirano et al. 1994).

# Antimikrobiális és herbivorok elleni, preformált védelem lehetséges szereplői

Az azonosított fehérjék második köre az elsőrendűen a patogén mikroorganizmusok ill. egyéb, pl. rágó kártevők elleni közvetlen aktivitású, vélhetően a preformált védekezésben szereplő fehérjéket foglalja magába. Ezek közt leggyakrabban *inhibitorok* illetve a növényi védekezést stimuláló, ún. *exogén elicitor-képző* fehérjék és PR-proteinek homológjai szerepelnek:

Az [Ex] foltból (30. ábra) első közelítésben homológia alapján azonosított, Ary és mtsai által egy rokon vadgabonafélében, a Jób könnyében (*Coix lacrima-jobi*) leírt (1989), kettős funkciójú **alfa-amiláz/endokitináz** részlegesen megszekvenált fehérje több szempontból is különleges. Egyrészt, a rovar eredetű nyál alfa-amilázok gátlásával a rágó kártevők emésztését nehezítheti, amely hosszabb távon a herbivor elkerülő magatartásához is vezethet. Másrészt, endokitináz aktivitása (kitináz I. osztály) révén egyes gombapatogének kitin tartalmú hifáinak és spórafalainak megbontásával, a kórokozó közvetlen gátlásán kívül növényi érzékelésüket segítő, exogén elicitorokat képes létrehozni. A szekvencia-hiányosságok miatt azonban még kérdéses, hogy búzafehérjénk valóban e proteinnek feleltethető-e meg a legjobban, vagy egy egyszerűbb felépítésű, csupán endokitináz aktivitású fehérjét izoláltunk – az izoforma preformált védelemben mindenesetre így is egyértelmű szerepet tölthet be.

Az azonosított búza **endo-1,3-béta-D-glükanáz**(ok) (30.ábra/[P2] folt) stressz elleni védekezésben és számos normál élettani folyamatban betölthető szerepeire az Irodalmi áttekintés fejezet 2.3.1.1 pontjában már részletesen kitértünk. A fiatal, fejlődő vegetatív szervekben a preformált védekezésen túl, normál élettani funkcióik közt pl. a sejtosztódás és sejtfal morfogenezis szabályozása és – az apoplaszt szempontjából kevéssé relevánsan – a floem-differenciálódás és áramlás befolyásolása (kallóz-dugók kialakítása és lebontása) is számon tartott. Mivel pedig a vizsgált apoplasztfehérjéink fiatal csíranövényből származtak, az azonosított béta-1,3-gükanáz(ok) az árpa csírázásában már megismert módon még az endospermiumból származó szénhidrátok elhúzódó mobilizálásában is szerepet játszhat(nak) (Fincher és Stone 1993).

A kimutatott (1,3;1,4)-béta-glükanáz búzafehérje (30. ábra/[F5] folt) transzkriptumát eredetileg egészséges csírázó 'Millewa' búzafajta géntérképezése során azonosították (Lai *et al.* 1993), de a fogékony 'Thatcher' búzafajta apoplasztjában is épp e proteinnek vagy közeli homológjának indukcióját bizonyíthattuk a levélrozsdafertőzéssel összefüggésben (12.B ábra/'1x'). A környezeti változásokra szerkezetileg meglehetősen érzékeny endoglükanáz csoport tagjai a növekvő sejtek elsődleges sejtfalában cellulózzal és egyéb nem cellulóz oligoszacharidokkal szorosan asszociált, rendezett szerveződésű (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4)-glükánok 1,4-kötéseinek bontására, továbbá a xiloglukánok

specifikus hasítására is képesek (Stewart et al. 2001, Minic és Jouanin 2006). Így nemcsak a fűféle egyszikűek sejtfal degradációjában és vegetatív szöveteik megnyúlásában, hanem kétszikű csíranövények növekvő sejtfalában is különösen nagy mennyiségben vannak jelen (Høj és Fincher 1995, Cosgrove 1999). S bár a csírázásban és a növekedésszabályozásban játszott szerepük vitathatatlan (Meikle et al. 1994), egyes képviselőik közreműködését már pl. gombafertőzés és fagystressz elleni védelemben is kimutatták (Nishizawa *et al.* 2003, Yaish *et al.* 2006).

Az MS-azonosítás során nyert és az adatbázis-adatokból nyilvánvaló volt, hogy búzánál az MSazonosítás ill. fehérje-szintű annotáció nem lesz problémamentes. Az alábbiakban két végletet szeretnék bemutatni:

#### Ismeretlen szerepkörű proteinek

A "minimalista oldal" - Az [**F1**] foltból (30. ábra) izolált, egyelőre ismeretlen búza apoplasztfehérjénk árpahomológjának ("**hipotetikus protein**") funkciójáról nem sokat tudhatunk azon kívül, hogy szekvenciája alapján az ún. BSP szupercsalád tagja (növényi, ABA-indukált, bázikus szekretált proteinek), és komoly homológiát mutat a legújabban felfedezett PR17 család több, szintén árpa PR17c prekurzorának szekvenciájával. Érdekesség, hogy árpában ugyanezen hipotetikus protein *indukcióját* is sikerült, s éppen egy PR17c prekurzorral együtt kimutatnunk kadmium-stresszel asszociáltan (vö. 5.2.1 fejezet - 28. ábra/[02] sáv, 29. ábra/[Xc] folt). A PR17 család szerepköréről azonban szintén igen gyér ismeretekkel rendelkezünk, bár tagjainak egy erősen konzervált hányada hasonlóságot mutat egy eukarióta exopeptidáz (aminopeptidáz N) ill egy bakteriális endopeptidáz (termolizin) aktív helyével és peptidkötő árkával.

# Igazoltan többszörös szerepkörű proteinek

Az azonosított fehérjék másik végletét egy olyan fehérjénk képviseli, amihez talán a kelleténél is több funkciót köthetünk, s épp a bőség zavara okozott jelentős nehézséget: A [G1, G2 és G4] foltból is azonosított **ADP-glükóz pirofoszfatáz**/foszfodiészteráz aktivitású búzafehérjéről, ill. 3 aminosavban eltérő árpa homológjáról szakirodalmi adatok alapján a cukor-nukleotidok arányát szabályzó kulcsenzimként beszélhetünk (Rodriguez-Lopez *et al.* 2001). Egyéb funkciói mellett, közvetve az apoplasztban lokalizált formájában sejtfal fenoloid–glikozidok, s így preformált védekezésben résztvevő fitoanticipinek (Vermerris és Nicholson 2006) előállításában is közreműködhet (37. ábra).



**37. ábra: Szekretált ADP-glükóz pirofoszforiláz** (8) lehetséges előkészítő szerepe antimikrobiális ill. rovarölő hatású fenol-glikozidok (12), mint anticipinek előállításában, a glikozilálásukban közreműködő cukornukleotidok szabályzása révén (*Forrás*: Böddi 1998)

A fehérje szekvenciális alapon ugyanakkor az ősi, diverz szerepkörű *cupin*-szupercsaládba tartozik, amelynek béta-redőikből hordó formába rendeződő tagjait jelenleg 18 funkcionális osztályba sorolják. Három legfontosabb klasztere egyikét az egy cupin-doménes, több alegységből álló, extracelluláris **germinszerű fehérjék** (**GLP**) alkotják (Khuri *et al.* 2001, Dunwell *et al.* 2001, 2004).

A GLP-k törzsfejlődéstanilag és egyben funkcionális alapon 3 ill. 5 további ágra bonthatók (Carter és Thornburg 1999). A névadó germin csoportot elsőként csírázó búzában, hőre, peroxidra és proteolízisre rezisztens, magi raktározó apoplasztfehérjeként izolálták, oxalát-oxidáz (OxO) és szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitással. Emiatt korábban, a germin jellegeket csak részben mutató GLP-ket is elsősorban SOD-ként funkcionáló, így oxidatív stressztől óvó glikoproteinekként tartották számon (Khuri *et al.* 2001). Mára azonban ismertté vált, hogy többszörös enzimaktivitásuk mellett sejtfali mobilitásukat változtató struktúrfehérjeként, sőt receptorként is szerepelhetnek egyes képviselőik (Bernier és Berna 2001). A GLP család jelentőségét mutatja, hogy képviselői az összes szervben jelen vannak, és számos normál differenciálódási folyamat mellett (virágzás indukció, gyümölcsérés, embriogenezis, magfejlődés, vízszállító elemek differenciációja, sejtfal szintézis), biotikus és abiotikus stresszek során és a bazális rezisztencia kialakításában is lehet szerepük (Berna és Bernier 1999, Bernier és Berna 2001, Dunwell *et al.* 2000, Thordahl-Christensen *et al.* 1997, továbbá Schweitzer *et al.* 1999, Hurkman és Tanaka 1991, 1996, Vallielian-Bindschedler *et al.* 

1998, Christensen *et al.* 2004). Így e "mindenes" funkciójú fehérjék egyes tagjaira a patogenezissel össszefüggésben **PR 15** (germin) és/vagy az oxalát-oxidáz aktivitással nem rendelkező **PR 16** család (GLP) tagjaiként is hivatkoznak (vö. 5. táblázat).

Hogy az MS-azonosított, domináns búzafehérjénk melyik csoporttal tart közelebbi rokonságot, arra a szekvencia-homológia vizsgálatából, továbbá más fajok 2D-PAGE apoplaszt fehérjemintázatának jellegzetességei alapján következtettünk:

ADP-glükóz pirofoszforiláz fehérjénk az árpában szintén konstitutívan kifejeződő germin-like protein 1-gyel (CAA75907 – Vallelian et al. 1998) és a germin-like protein 2a-val (ABG46233 – Zimmermann et al. 2006) volt leginkább rokonítható, amelyek közül utóbbi az egyéb vizsgált germin-like ágakat képviselő fehérjéktől eltérően csak a megnyúló, 0-10 napos első levélre specifikusan expresszálódik (Rodriguez-Lopez et al. 2001), cirkadián kontroll alatt áll, és hideghatást kivéve a legtöbb környezeti stresszre (patogén támadás, ózon és  $H_2O_2$  kezelés) csökkenést mutat.

Vizsgálataink során végül két konzervatív régió (B és C box), valamint egy interakciós szerepű (KGD/RGD/KGR) motívum KGD-formájának egyértelmű azonosításával sikerül igazolnunk, hogy az adatbázis alapján általunk korábban ADP-glükóz pirofoszfatázként kimutatott fehérje a germinszerű proteineknek (GLP) is képviselője. Továbbá, a monomerek töltés és tömegjellege alapján valószínű, hogy megegyezik a Segarra és mtsai által (2003) leírt, 66-69 kDa aktív formájú, N-glükoprotein jellegű GLP-vel, amely SOD aktivitása mellett szerin-proteáz inhibitor funkcióval is bír, s expressziója gombafertőzéssel (Septoria tritici) is befolyásolható. A KGD-formában szintén kimutatott, s a GLP-k több mint felében (leginkább KGD vagy RGD, ritkábban KGE tripeptid alakban) jellemző motívum egyes állati, extracelluláris sejtadhéziós proteinekben is általános, bár ott a motívum RGD-változata a jellemző (Bernier és Berna 2001). A sejtfallal / extracelluláris közeggel alkotott sejtváz interakciók RGD-függő típusának jelenléte ugyanakkor növényekben is bizonyított. Úgy tűnik, az RGD-motívum növényi – mikrobiális interakciókban is alapvető jelentőségű, mind szimbiotikus (Swart et al. 1994), mind patogén sejtsejtkapcsolatok szabályozásában (Senchou et al. 2004)., habár az ezért felelős fehérjék közvetlen azonosítása még várat magára (Labouré et al. 1999, Barthou et al. 1999).

Előbbiek miatt az apoplasztban azonosított fehérjénk relevanciája még inkább megerősíthető.

# M2. Irodalomjegyzék

- ABAD L.R., D'URZO M.P., LIN D., NARASIMHAN M.L., RENVENI M., ZHU J.K., NIU X., SINGH N.K., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1996): Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118: 11-23.
- AGRAWAL G.K., RAKWAL R. (2006): Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. Mass Spectrometry Reviews 25: 1–53.
- AGRAWAL G.K., YONEKURA M., IWAHASHI Y., IWAHASHI H., RAKWAL R. (2005): System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part I: Technologies in proteome establishment. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 5;815(1-2):109-123.
- AGRAWAL G.K., YONEKURA M., IWAHASHI Y., IWAHASHI H., RAKWAL R. (2005): System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part II: Proteomes of the complex developmental stages. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 5;815(1-2):125-136.
- 5. AGRAWAL G.K., YONEKURA M., IWAHASHI Y., IWAHASHI H., RAKWAL R. (2005): System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *J Chromatogr B* Analyt Technol Biomed Life Sci. 5;815(1-2):137-45.
- AHSAN N., LEE D-G., LEE S-H., KANG K.Y., BAHKA J.D., CHOI M.S., LEE I-J., RENAUT J., LEE B-H. (2007a): A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiol Plant* 131(4):555-70
- AHSAN N., LEE S.H., LEE D.G., LEE H., LEE S.W., BAHK J.D., LEE B.H. (2007): Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. C R Biol. 330(10):735-46.
- AHSAN N., LEE S-H., LEE D-G., LEE H., LEE S.W., BAHK J.D., LEE B-H. (2007b): Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity *C. R. Biologies* 330:735–746.
- AINA R., LABRA M., FUMAGALLI P., VANNINI C., MARSONI M., CUCCHI U. et al. (2007): Thiolpeptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ Exp Botany* 59: 389-392.
- AKIYAMA T., ARUMUGAM PILLAI M. (2001): Molecular cloning, characterization and *in vitro* expression of a novel endo-1,3-β-glucanase up-regulated by ABA and drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Science* 161 (6): 1089-1098.
- AKIYAMA T., ARUMUGAM PILLAI M., SENTOKU N. (2004): Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3-b-glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. *Planta* 220: 129–139.
- AKIYAMA T., JIN S., YOSHIDA M., HOSHINO T., OPASSIRI R., KETUDAT CAIRNS J.R. (2009): Expression of an endo-(1,3;1,4)-β-glucanase in response to wounding, methyljasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. *J Plant Physiol* 166:1814—1825.
- ALCÁNTARA E., ROMERA F.J., CAÑETE M., DE LA GUARDIA M.D. (1994): Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. J Exp Bot 45, 1893-1898
- 14. ALEANDRI M.P., MAGRO P., CHILOSI G. (2008): Influence of environmental pH modulation on efficiency of apoplastic PR proteins during *Fusarium culmorum* wheat seedling interaction. *Plant Pathology* 57(6):1017-1025.
- ALI G.M., KOMATSU S. (2006): Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. J. Proteome Res 5 (2): 396–403.

- 16. ALLOUIS S., MOORE G., BELLEC A., SHARP R., FAIVRE RAMPANT P., MORTIMER K. et al. (2003): Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germplasm 'Chinese Spring'. *Cereal Research Communications* 31:331–338.
- ALOUI A., RECORBET G., GOLLOTTE A., ROBERT F., VALOT B., GIANINAZZI-PEARSON V., ASCHI-SMITI S., DUMAS-GAUDOT E. (2008): On the mechanisms of cadmium stress alleviation in Medicago truncatula by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics* 9(2): 420-433.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- 19. ALVES M., FRANSISCO R., MARTINS I., RICARDO C.P.P. (2006): Analysis of *Lupinus albus* leaf apoplastic proteins in response to boron deficiency. *Plant and soil* 279, 1-11.
- ANDON N.L., HOLLINGWORTH S., KOLLER A., GEENLAND A.J., YATES J.R., HAYNES P.A. (2002): Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectroscopy, *Proteomics* 2, 1156–1168.
- 21. ANGUELOVA V.S., VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z.A. (1999): Intercellular proteins and beta-1,3-glucanase activity associated with leaf rust resistance in wheat. *Physiol Plantarum* 106:393-401.
- 22. ANGUELOVA-MERHAR V.S., VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z.A. (2002): Intercellular chitinase and peroxidase activities associated with resistance conferred by geneLr35 to leaf rust of wheat .*Journal of Plant Physiology* 159(11):1259-1261
- 23. ANGUELOVA-MERHAR V.S., VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z.A. (2001): Beta-1,3glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat leaf rust. *J Phytopathology 149, 381-384*.
- 24. ANTELMANN H., TJALSMA H., VOIGT B., OHLMEIER S., BRON S., VAN DIJL J.M., HECKER M. (2001): A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res* 11(9):1484-502.
- 25. ANTONIW J.F., RITTER C.E., PIERPOINT W.S., VAN LOON L.C. (1980): Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* 47: 79-87.
- ANZLOVAR S., DALLA SERRA M., DERMASTIA M., MENESTRINA G. (1998): Membrane Permeabilizing Activity of Pathogenesis-Related Protein Linusitin from Flax Seed MPMI Vol. 11, No. 7, 1998, pp. 610–617.
- ARY M.B., RICHARDSON M., SHEWRY P.R. (1989): Purification and characterization of an insect alphaamylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi*). Biochim. Biophys. Acta 999 (3), 260-266.
- ASTOLFI S., SUCHI S., PASSERA C. (2004): Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (Zea Mays L.) leaves. *J Plant Physiol* 161, 795-82.
- BÅGA M., CHIBBAR R.N., KARTHA K.K. (1995): Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat. *Plant Mol. Biol.* 29:647-662.
- 30. BAHLSBERG-PAHLSSON A.M. (1989): Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants.*Water* Air Soil Poll 47, 287-319.
- BAHRMAN N., LE GOUIS J., NEGRONI L., AMILHAT L., LEROY P., LAINÉ A.L., JAMINON O. (2004b): Differential protein expression assessed by two-dimensional gel electrophoresis for two wheat varieties grown at four nitrogen levels. *Proteomics* 4(3):709-19.
- 32. BAHRMAN N., NEGRONI L., JAMINON O., LE GOUIS J. (2004a): Wheat leaf proteome analysis using sequence data of proteins separated by two-dimensional electrophoresis, *Proteomics* 4(9):2672-2884.
- BAK-JENSEN KS, LAUGESEN S, ROEPSTORFF P, SVENSSON B. (2004): Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6-11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *Proteomics* 4(3):728-42.
- 34. BALLANCE G.M., SVENDSEN I. (1988): Purification and amino acid sequence determination of an endo-1,3-beta-glucanase from barley. *Carlsberg Res Commun* 53(7):411-419.

- BALMER Y., VENSEL W.H., DUPONT F.M., BUCHANAN B.B., HURKMAN W.J. (2006): Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. J Exp Bot 57(7): 1591-1602.
- 36. BARNA B., IBENTHAL W.D., HEITEFUSS R. (1989): Extracellular RNase activity in healthy and rust infected wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35(2):151-160.
- 37. BARTHOU H., PETITPREZ M., BRIE'RE C., SOUVRE' A., ALIBERT G. (1999): RGDmediated membrane-matrix adhesion triggers agarose-induced embryoid formation in sunflower protoplasts. *Protoplasma* 206: 143–151.
- BARTNICKI-GARCIA S. (1968): Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22: 87–108.
- 39. BARTOS P., SAMBORSKI D.J., DYCK R.L. (1969): Leaf rust resistance of some European varieties of wheat. *Can. J. Botany* 47: 543-546.
- BASU U., FRANCIS J.L., WHITTAL R.M., STEPHENS J.L., WANG Y., ZAIANE O.R., GOEBEL R., MUENCH D.G., GOOD A.G., TAYLOR G.J. (2006): Extracellular Proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* Roots: Analysis and Comparison by MudPIT and LC-MS/MS. *Plant Soil* 286 (1-2):357–376.
- BAYER E.M., BOTTRILL A.R., WALSHAW J., VIGOUROUX M., NALDRETT M.J., THOMAS C.L., MAULE A.J. (2006): Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6: 301–311
- 42. BECKERS G.J.M., SPOEL S.H. (2006): Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biology* 8: 1–10.
- BÉKÉSIOVÁ B., HRAŠKA Ś., LIBANTOVA J., MORAVČÍKOVA J., ´MATUŠÍKOVA I. (2008): Heavymetal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Mol Biol Rep* 35:579–588.
- 44. BENAVIDES M.P., GALLEGO S.M., TOMARO M.L. (2005): Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17, 21-34.
- 45. BENDTSEN J.D., JENSEN L.J., BLOM N., VON HEIJNE G., BRUNAK S. (2004a): Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17: 349–356
- 46. BENDTSEN J.D., NIELSEN H., VON HEIJNE G., BRUNAK S. (2004b): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783–795
- 47. BENEDEK P. (1993): A rozsdabetegségek epidemiológiája és előrejelzése. Növényvédelem 29(11): 513-515.
- BERKELMAN T. (2008): Quantitation of Protein in Samples Prepared for 2-D Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 424 (1): 43-49.
- BERNA A., BERNIER F. (1997): Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of athe heterologous protein. *Plant Mol Biol* 33: 417-429.
- 50. BERNA A., BERNIER F. (1999): Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing enzyme. *Plant Molecular Biology* 39, 539-549.
- 51. BERNIER F., BERNA A. (2001): Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins, but what do they do exactly? *Plant physiology and Biochemistry* 39, 545-554.
- BERTINI L., CASCONE A., TUCCI M., D'AMORE R., DI BERARDINO I., BUONOCORE V., CAPORALE C., CARUSO C. (2006): Molecular and functional analysis of new members of the wheat PR4 gene family. *Biol. Chem.* 387 (8):1101-1111.
- BHADAURIA V., BANNIZA S., WANG L-X., WEI Y-D., PENG Y-L. (2009): Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *European Journal of Plant Pathology* 126 (1): 81-95.
- 54. BHALLA P.L., DALLING M.J. (1984) Characteristics of a b-galactosidase associated with the stroma of chloroplasts prepared from mesophyll protoplasts of the primary leaf of wheat. *Plant Physiol* 76: 92-95
- 55. BLINDA A., KOCH B., RAMANJULU S., DIETZ K-I. (1997): *De novo* synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. *Plant Cell and Environment* 20, 969-981.
- 56. BOLTON M.D., KOLMER J.A., GARVIN D.F. (2008): Pathogen profile Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Mol Plant Pathol* 9(5), 563–575.

- 57. BONAS U., LAHAYE T.H. (2002): Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion Microbiol* 5:44–50.
- 58. BØNSAGER B.C., FINNIE C., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2007): Spatio-temporal changes in germination and radical elongation of barley seeds tracked by proteome analysis of dissected embryo, aleurone layer, and endosperm tissues. *Proteomics* 7(24):4528-40.
- 59. BORDERIES G., JAMET E., LAFITTE C., ROSSIGNOL M., JAUNEAU A., BOUDART G., MONSARRAT B., ESQUERRÉ-TUGAYÉ M.T., BOUDET A., PONT-LEZICA R. (2003): Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24:3421-32
- 60. BORNER G.H., SHERRIER D.J., WEIMAR T., MICHAELSON L.V., HAWKINS N.D., MACASKILL A., NAPIER J.A., BEALE M.H., LILLEY K.S., DUPREE P. (2005): Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*: Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol*. 137: 104–116.
- 61. BOUDART G., JAMET E., ROSSIGNOL M., LAFITTE C., BORDERIES G., JAUNEAU A., ESQUERRÉ-TUGAYÉ M-T., PONT-LEZICA R. (2005): Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5:212-221
- 62. BOUDART G., MINIC Z., ALBENNE C., CANUT H., JAMET E., PONT-LEZICA R. (2007): Cell wall proteome. *In*: Plant proteomics (Szerk. S. Samaj, J. Thelen), Springer, Berlin, pp 169-185.
- 63. BÖDDI B. (1998): Szénhidrát-anyagcsere és légzés. In: Láng Z (Szerk.): Növényélettan. A növényi anyagcsere. (Egyetemi tankönyv). 5. fejezet, 278. p. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 1998.
- 64. BREITENEDER H. (2004): Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 59(5):479-81.
- 65. BROECKLING C.D., HUHMAN D.V., FARAG M.A., SMITH J.T., MAY G.D., MENDES P., DIXON R.A., SUMNER L.W. (2005): Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* 56(410):323-336.
- 66. BROGLIE R, BROGUE K. (1993): Chitinase and plant protection. *In: Fritig B, Legrand M, eds. Mechanisms of plant defense responses. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers* p. 411–421.
- 67. BROWDER L.E. (1980): A compendium of information about named genes for low reaction to *Puccinia recondita*. *Crop Science* 20: 775-779.
- 68. BRUNE A., URBACH W., DIETZ K.J. (1994). Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell Environ* 17, 153-162.
- 69. BRYNGELSSON T., SOMMER-KNUDSEN J., GREGERSEN P.L., COLLINGE D.B., EK B., THORDAL-CHRISTENSEN H. (1994): Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Mol Plant Microbe Interact* 7(2):267-75.
- BUCCIAGLIA PA, SMITH AG. (1994): Cloning and characterization of *Tag1*, a tobacco anther β-1,3glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Mol Biol* 24:903-914.
- 71. BUCHET J.P., LAUWERYS R., ROELS H., BERNARD A., BRUAUX P., CLAEYS F., DUCOFFRE G., DE PLAEN P., STAESSEN J., AMERY A., LINJEN P., THIJS L., RONDA D., SARTOR F., SAINT REMY A., NICK L. (1990): Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336: 699-702.
- 72. BUCKERIDGE MS., RAYON C., URBANOWICZ B., TINE MAS., CARPITA N.C. (2004): Mixed linkage (1-3),(1-4)-D-glucans of grasses. *Phytochemistry* 81:115–27.
- BUSHNELL W.R. (1984): Structural and physiological alterations in susceptible host tissue. In: BUSHNELL
  W. R. & ROELFS A. P. (Eds.), The Cereal Rusts, pp. 471-507. Academic Press, Orlando.
- 74. CÁNOVAS F.M., DUMAS-GAUDOT E., RECORBERT G., JORRÍN J., MOCK H.P., ROSSIGNOL M. (2004): Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- 75. CAO H., GLAZEBROOK J., CLARKE J.D., VOLKO S., DONG X. (1997): The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic aquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57-63.
- 76. CARPITA N.C. (1996): Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445–76.
- 77. CARTER C., THORNBURG R.W. (1999): Germin-like proteins: structure, phylogeny, and function. *Journal* of *Plant Biology* 42(2):97-108.

- CARUSO C., CAPORALE C., CHILOSI G., VACCA F., BERTINI L., MAGRO P., POERIO E. BUONOCORE V. (1996): Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel J. Protein Chem. 15 (1), 35-44 (1996)
- 79. CARUSO G., CAVALIERE C., GUARINO C., GUBBIOTTI R., FOGLIA P., LAGANÀ A. (2008): Identification of changes in Triticum durum L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:381–390.
- 80. CASANO L.M., LASCANO H.R., TRIPPI V.S. (1994): Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplast. *Plant Cell Physiol* 35:145–152.
- 81. CASTILLEJO M.Á., MIGUEL CURTO M., DUMAS-GAUDOT E., RUBIALES D., MALDONADO A.M., JORRÍN J.V. (2004): Proteomics as a high throughput global approach to understand parasitic angiospermhost symbioses. COST Action 849, Parasitic Plant Management in sustainable Agriculture. Meeting on Mechanisms of susceptibility and resistance in parasitic angiosperm-host symbioses: a comparative approach (2004, Wageningen)
- 82. CASTILLEJO M.Á., MIGUEL CURTO M., DUMAS-GAUDOT E., RUBIALESD., MALDONADO A.M., JORRÍN J.V. (2004): Proteomics as a high throughput global approach to understand parasitic angiosperm-host symbioses. COST Action 849, Parasitic Plant Management in sustainable Agriculture. Meeting on Mechanisms of susceptibility and resistance in parasitic angiosperm-host symbioses: a comparative approach (2004, Wageningen)
- CHAFFEI C., PAGEAU K., SUZUKI A., GOUIA H., GHORBEL H.M., MASCALAUX-DAUBRESSE C. (2004): Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol* 45, 1681-1693.
- CHANG C.T., LO H.F., WU C.J., SUNG H.Y. (1992): Purification and properties of chitinase from cabbage. Biochem Int 28:707–715.
- CHAOUI A., JARRAR B., EL FERJANI E. (2004): Effects of cadmium and copper on peroxidase NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. J. *Plant Physiol.* 161, 1225–1234.
- CHAOUI A., MAZHOUDI S., GHORBAL M.H., EL FERJANI E. (1997): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127, 139–147.
- 87. CHEŁKOWSKI J., STĘPIEŃ Ł. (2001): Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. Appl. Genet. 42(2), 117-126
- CHELKOWSKI, J., GOLKA L., STEPIEN L. (2003): Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. J. Appl. Genet. 44(3):323-338.
- CHEN S.L., KAO C.H. (1995): Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 17,67–71.
- CHEN X.Y., KIM S.T., CHO W.K., RIM Y., KIM S., KIM S.W., KANG K.Y., PARK Z.Y., KIM J.Y. (2008): Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli. *J Plant Physiol in press*
- CHEN Y.X., HE Y.F., LUO Y.M., YU Y.L., LIN Q., WON, M.H. (2003): Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50, 789–793.
- 92. CHESTERS C.G., BULL A.T. (1963a): The enzymic degradation of laminarin. 1. The distribution of laminarinase among micro-organisms. Biochem J.;86:28–31.
- 93. CHESTERS C.G., BULL A.T. (1963b):The enzymic degradation of laminarin. 3. Some effects of temperature pH and various chemical reagents on fungal laminarinases. Biochem J.;86:38–46.
- CHIKOV V.I., BAKIROVA G.G. (2004): Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis and plant productivity. *Russ J Plant Physiol*; 51:420-31.
- 95. CHISHOLM S.T., COAKER G., DAY B., STASKAWICZ B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- 96. CHIVASA S. NDIMBA B. SIMON W. ROBERTSON D. YU X-L. KNOX J. BOLWELL P. SLABAS A. (2002): Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23:1754-1765

- 97. CHOU W.K., CHEN X.Y., CHU H., RIM Y., KIM S., KIM S.T., KIM S-W., PARK Z-Y., KIM J-Y. (2009): The proteomic analysis of the secretome of rice calli. *Physiol Plant*, 135: 331-341.
- 98. CHRISTENSEN A.B., CHO B.H., NAESBY M., GREGERSEN P.L., BRANDT J., MADRIZ-ORDENANA K., COLLINGE D., THORDAL-CHRISTENSEN H. (2002): The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 3 (3): 135-144
- 99. CHRISTENSEN A.B., THORDAL-CHRISTENSEN H., ZIMMERMANN G., GJETTING T., LYNGKJAER M.F., DUDLER R., SCHWEIZER P. (2004): The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(1):109-17.
- 100. CLEMENS S. (2006a): Evolution and function of phytochelatin synthase. J Plant Physiol 163, 319-332.
- 101. CLEMENS S. (2006b): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707–1719
- 102. CLOUTIER S., MCCALLUM B.D., LOUTRE C., BANKS T.W., WICKER T., FEUILLET C., KELLER B., JORDAN M.C. (2007): Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (Triticum aestivum L.) is a member of the large psr567 gene family. *Plant Mol. Biol.* 65, 93–106.
- COBBETT C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123, 825-832.
- 104. COBBETT C.S., GOLDSBROUGHT P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 53, 159-182.
- 105. COCK J.M., McCORMICK S. (2001): A Large Family of Genes That Share Homology with CLAVATA3. *Plant Physiol* 126, 939-942.
- COFFEEN W.C., WOLPERT T.J. (2004): Purification and Characterization of Serine Proteases That Exhibit Caspase-Like Activity and Are Associated with Programmed Cell Death in Avena sativa. The Plant Cell 16(4):857-73.
- 107. COLLINGE D.B., KRAGH K.M., MIKKELSEN J.D., NIELSEN K.K., RASMUSSEN V., VAD K. (1993): Plant chitinases, Plant J 3:31-40.
- CORCHETE MP, GUERRA H (1987) a- and b-galactosidase activities in protein bodies and cell walls of lentil seed cotyledons. *Phytochemistry* 26: 927-932
- 109. COSGROVE D.J. (1999): Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 391–417.
- CUI J., BAHRAMI A.K., PRINGLE E.G., HERNANDEZ-GUZMAN G., BENDER C.L., PIERCE N.E., AUSUBEL F.M. (2005): *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1791–1796.
- 111. CURTIS M.J., WOLPERT T.J. (2004): The victorin induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. Plant J 38(2):244-259.
- 112. CSERHÁTI M, PONGOR S, GYÖRGYEY J. (2005): Statistical methods for finding biologically relevant motifs in promoter regions and a few of its implementations. In: LEHOCZKY L, KALMAR L (szerk.): 5TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF PHD STUDENTS. Miskolc: UNIVERSITY OF MISKOLC, 2005. pp. 41-46.
- 113. CSŐSZ L.NÉ (2007): Növénykórtani és rezisztencia vizsgálatok az őszi búza rozsda, lisztharmat és levélfoltosságok kórokozóival. Doktori (PhD) értekezés, Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely.
- CSŐSZ M., MESTERHÁZY A., SZUNICS L., VIDA GY., MANNINGER K. (2000): Leaf rust resistance of the wheat Lr near-isogenic lines in adult stage in Hungary, 1995-1999. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 35(1-4): 177-185.
- 115. DALCORSO G., FARINATI S., MAISTRI S., FURINI A. (2008): How Plants Cope with Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression. *J Integr Plant Biol* 50 (10): 1268-1280.
- 116. DANA M.M., PINTOR-TORO J.A., CUBERO B. (2006): Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142:722–730.

- 117. DANI V., SIMON W.J., DURANTI M., CROY R.R.D. (2005) Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, 5 737-745
- 118. DATTA K., VELAZHAHAN R., OLIVA N., ONA I., MEW T., KHUSH G.S., MUTHUKRISHNAN S., DATTA S.K. (1999): Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to Rhizoctonia solani causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet* 98, 1138–1145.
- DAVIES WJ, WILKINSON S, LOVEYS B. (2002): Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase the water use efficiency in agriculture. *New Phytologist* 153, 449– 460.
- 120. DAVRANOV K., AKHMEDOVA Z.R., BEZBORODOV A.M. (1983): Isolaton of a lipase inhibitor from the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chemistry of Natural Compounds* 19(3):352-354.
- 121. DE JONG A.J., CORDEWENER J., LO SCHIAVO F. *et al.* (1992): A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4: 425–433.
- 122. DE JONG M., VAN BREUKELEN B., WITTINK F.R., MENKE F.L., WEISBEEK P.J., VAN DEN ACKERVEKEN G. (2006): Membrane-associated transcripts in *Arabidopsis*; their isolation and characterization by DNA microarray analysis and bioinformatics. *Plant J* 46: 708–721
- 123. DE TORRES-ZABALA M., TRUMAN W., BENNETT M.H., LAFFORGUE G., MANSFIELD J.W., EGEA P.R., BÖGRE L., GRANT M. (2007): Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* 26:1434–1443.
- 124. DEL CARMEN CÓRDOBA-PEDREGOSA M., CÓRDOBA F., VILLALBA J.M., GONZÁLEZ-REYES J.A. (2003): Zonal changes in ascorbate and hydrogen-peroxide contents, peroxidase and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiol*. 131: 697-706.
- 125. DELAURÉ S.L., VAN HEMELRIJCK W., DE BOLLE M.F.C., CAMMUE B.P.A., DE CONINCK B.M.A. (2008): Building up plant defenses by breaking down proteins. Plant Science 174 (4) 375-385
- 126. DELHAIZE E.P., RYAN R. (1995): Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol* 107, 315-321.
- 127. DENAULT L.J., ALLEN W.G., BOYER E.W. et al. (1978): A simple reducing sugar assay for measuring β-Glucanase activity in Malt, and various microbial enzyme preparations. American Society of Brewing Chemists Journal, 36: 18-23
- 128. DESIMONE M., HENKE A., WAGNER E. (1996): Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol* 111: 789–796
- 129. DEVOS S., LAUKENS K., DECKERS P., VAN DER STRAETEN D., BEECKMAN T., INZÉ D., VAN ONCKELEN H., WITTERS E., PRINSEN E. (2006): A Hormone and Proteome Approach to Picturing the Initial Metabolic Events During *Plasmodiophora brassicae* Infection on *Arabidopsis. MPMI* 19(12):1431-1443
- 130. DIDIERJEAN L., FRENDO P., NASSER W., GENOT G., MARIVET J., BURKHARD G. (1996): Heavymetal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* 199:1-8.
- 131. DIETZ KJ, SAUTER A, WICHERT K, MESSDAGHI D, HARTUNG W. (2000): Extracellular betaglucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot*. 51(346):937-44.
- 132. DIETZ K-J. (1997): Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Prog Bot* 58, 221-254.
- 133. DIXON D.P., HAWKINS T., HUSSEY P.J., EDWARDS R. (2009): Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily *J Exp Bot* 60(4):1207-18.
- 134. DONG J., WU F., ZHANG G. (2006): Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). Chemosphere 64, 1659-1666.
- 135. DONG JZ, DUNSTAN DI. (1997): Endochitinase and β-1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201(2):189-194.
- 136. DONG X. (1998): SA, JA and disease resistance in plants. Curr Op Plant Biol 1: 316-323.
- 137. DONNELLY B.E., MADDEN R.D., AYOUBI P., PORTER D.R., DILLWITH J.W. (2005): The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome. *Proteomics* 5(6):1624-33.

- DORNEZ E., GEBRUERS K., DELCOUR J.A., COURTIN C.M. (2009): Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends in Food Science & Technology* 20 (11-12):495-510.
- 139. DOXEY A.C., YAISH M.W.F., MOFFATT B.A., GRIFFITH M., MCCONKEY B.J. (2007): Functional Divergence in the Arabidopsis β-1,3-Glucanase Gene Family Inferred by Phylogenetic Reconstruction of Expression States. *Molecular Biology and Evolution*, 24(4):1045-1055
- 140. DREHER K., CALLIS J. (2007): Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. Ann Bot. 99(5):787-822.
- 141. DUGGAL V., JELLIS G. J., HOLLINS T. W., STRATFORD R. (2000): Resistance to powdery mildew in mutant lines of the susceptible wheat cultivar Hobbit 'sib'. *Plant Pathology* 49: 468–476.
- 142. DUNWELL J.M, KHURI S., GANE P.J. (2000): Microbial Relatives of the Seed Storage Proteins of Higher Plants: Conservation of Structure and Diversification of Function during Evolution of the Cupin Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (1): 153-179
- 143. DUNWELL J.M., CULHAM A., CARTER C.E., SOSA-AGUIRRE C.R., GOODENOUGH P.W. (2001): Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci.* 26(12):740-6.
- 144. DUNWELL J.M., PURVIS A., KHURI S. (2004): Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry*. 65(1):7-17.
- 145. ĎURČEKOVÁ K., , HUTTOVÁ J., ´ MISTRÍK I., OLLEÉ M., TAMÁS L. (2007): Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant Soil* 290:61–68.
- 146. DÜRING K. (1993): Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? Plant Mol Biol 23: 209-214.
- 147. DYCK P.L., SAMBORSKI D.J. (1968): Genetics of resistance to leaf rust in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakof and Centenario. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 10: 7-17.
- 148. DYGERT, S., LI, L. H., FLORIDA, D. et al. 1965. Determination of Reducing Sugar with Improved Precision. Analytical Biochemistry, 13: 367-374.
- 149. EDWARDS R., DIXON D.P. (2005): Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:169-86.
- 150. ELLIS J.G., DODDS P.N., LAWRENCE G.J. (2007): The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powderly mildew and smut fungi. *Curr Op. Microbiol.* 10(4): 326-331.
- 151. ELLIS R.J. (1979): The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci* 4(11):241-244.
- 152. EMANUELSSON O., BRUNAK S., VON HEIJNE G., NIELSEN H. (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971.
- 153. EPPLE P., APEL K., BOHLMANN H. (1995): An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol. 109: 813-820.
- 154. ERDELI L., REALE L., FERRARI F., PASQUALINI S. (2004): Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. Physiol. Plant., *121*: 66–74.
- 155. ERNST D., BODEMANN A., SCHMELZER E., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H.J. (1996): β-1,3-Glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum* L. cv. BEL W3 after ozone fumigation. *J Plant Physiol* 148:215-221.
- 156. ERNST W.H., KRAUSS G.J., VERKLEIJ J.A.C., WESENBERG D. (2008): Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant* Cell Environ 31, 123-143.
- 157. ETZLER M.E. (1998): Oligosaccharide signaling of plant cells. J. Cell. Biochem. Suppl. 30-31: 123–128.
- 158. FARIS J.D., LI W.L., LIU D.J., CHEN P.D., GILL, B.S. (1999): Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98:219-225.
- FECHT-CHRISTOFFERS M.M., BRAUN H-P., LEMAITRE-GUILLIER C., VANDORSSELAER HORST W.J. (2003b): Effect of Manganese Toxicity on the Proteome of the Leaf Apoplast in Cowpea. *Plant Physiol* 133: 1935-1946.
- 160. FECHT-CHRISTOFFERS M.M., MAIER P., HORST W.J. (2003a): Apoplastic peroxidase and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiol Plant* 117: 237-244.
- 161. FEIZ L., IRSHAD M., PONT-LEZICA R.F., CANUT H., JAMET E. (2006): Evaluation of cell wall preparations for cell wall proteomics. *Plant Methods* 2:10

- 162. FELLE H.H. (1998): The apoplast pH of the Zea mays root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *Journal of Experimental Botany* 49:987-995.
- *163.* FELSENSTEIN J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- 164. FEUILLET C., MESSMER M., SCHACHERMAYR G., KELLER B. (1995). Genetical and physical characterization of the Lr 1 leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol. Gen. Genet. 248: 553-562.
- 165. FEUILLET C., TRAVELLA S., STEIN N., ALBAR L., NUBLAT L., KELLER B. (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (Triticum aestivum L.) genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 15253–15258.
- 166. FEYS B.J., PARKER J.E. (2000): Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16 (10): 449-455.
- 167. FINCHER G.B. (2009): Revolutionary Times in Our Understanding of Cell Wall Biosynthesis and Remodeling in the Grasses. *Plant Physiology* 149:27-37.
- 168. FINCHER G.B., STONE B.A. (1993): Physiology and biochemistry of germination in barley. In: MacGregor AW, Bhatty RS, eds. Barley: chemistry and technology. St. Paul: AACC, American Association of Cereal Chemists 1993:247-295.
- 169. FINNIE C, MAEDA K, ØSTERGAARD O, BAK-JENSEN KS, LARSEN J, SVENSSON B. (2004b): Aspects of the barley seed proteome during development and germination. *Biochem Soc Trans.* 32(Pt3):517-9. Review
- 170. FINNIE C., MELCHIOR S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2002): Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiol*. 129(3):1308-19.
- 171. FINNIE C., STEENHOLDT T., RODA NOGUERA O., KNUDSEN S., LARSEN J., BRINCH-PEDERSEN H., BACH HOLM P., OLSEN O., SVENSSON B. (2004a): Environmental and transgene expression effects on the barley seed proteome. *Phytochemistry* 65(11):1619-27.
- 172. FINNIE C., SVENSSON B. (2009): Barley seed proteomics from spots to structures, J. Proteomics 72, 315–324.
- 173. FLURY T., WAGNER E., KREUZ K. (1996): An Inducible Glutathione S-Transferase in Soybean Hypocotyl Is Localized in the Apoplast. *Plant Physiol* 112:1185-1190
- 174. FODOR E., SZABÓ-NAGY A., ERDEI L. (1995): The effects of cadmium on the fluidity and H+-ATPase activity of plasma membranefrom sunlower and wheat roots. *J Plant Physiol* 147:87-92.
- 175. FODOR F. (2003): Ólom és cadmium-stressz növényekben. Bot. Közlem. 90(1-2):107-120.
- 176. FOFANA B., BANKS T.W., MCCALLUM B., STRELKOV S.E., CLOUTIER S. (2007): Temporal Gene Expression Profiling of the Wheat Leaf rust Pathosystem Using cDNA Microarray Reveals Differences in Compatible and Incompatible Defence Pathways. *International Journal of Plant Genomics*. Article ID 17542, 13 pages
- 177. FOLK Gy., GLITS M. (1978): Növénykórtan 2. Bp., Kertészeti Egyetem.
- 178. FONTAINE T., SIMENEL C., DUBREUCQ G., ADAM O., DELEPIERRE M., LEMOINE J., VORGIAS C.E., DIAQUIN M., LATGÉ J.P. (2000): Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of Aspergillus fumigatus cell wall. J Biol Chem. 275(36):27594-607.
- 179. FRANCO O.L., RIGDEN D.J., MELO F.R., GROSSI-DE-SÁ M.F. (2002): Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur J Biochem* 269(2):397-412.
- FUHRER J. (1982): Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris L.*) *Plant Physiol* 70: 162-167.
- FUKUDA Y. (1996): Coordinated activation of chitinase genes and extracellular alkalinizationin suspensioncultured tobacco cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60,2005–2010.
- FUSCO N., MICHELETTO L., DAL CORSO G., BORGATO L., FURINI A. (2005): Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *J Exp Bot* 56, 3017-3027.

- G. PEARCE, C.A. RYAN (2003): Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. Proc Natl Acad Sci USA 100(2):14577-80.
- 184. GABRIEL R., KESSELMEIER J. (1999): Apoplastic Solute Concentrations of Organic Acids and Mineral Nutrients in the Leaves of Several Fagaceae *Plant and Cell Physiology* 40 (6): 604-612
- 185. GAO D., TREWAVAS A.J.T., KNIGHT M.R., SATTELMACHER B., PLIETH C. (2004): Selfreporting *Arabidopsis thaliana* expressing pH- and [Ca<sup>2+</sup>]-indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol* 134:898-908.
- GARCÍA-OLMEDO F., MOLINA A., SEGURA A., MORENO M. (1995): The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 3: 72-74.
- 187. GAUDET D.A., LAROCHE A., FRICK M., DAVOREN J., PUCHALSKI B., ERGON Å. (2000): Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (1): 15-24
- 188. GE C., DING Y., WANG Z., WAN D., WANG Y., SHANG Q., LUO S. (2009): Response of wheat seedlings to cadmium, mercury adn trichlorobenzene stresses. J Environ Sci (China) 21(6):806-813
- GE C-L., WANG Z-G., WAN D-Z., DING Y., WANG Y-L., SHANG Q.I., LUO S-S. (2009): Proteomic Study for Responses to Cadmium Stress in Rice Seedlings. *Rice Science* 16(1): 33–44
- 190. GEDDES J., EUDES F., LAROCHE A., BRENT SELINGER L. (2008): Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*. PROTEOMICS 8 (3):545 – 554
- 191. GHELIS T., DELLIS O., JEANNETTE E., BARDAT F., MIGINIAC E., SOTT B. (2000): Abscizic acid plasmalemma perception triggers a calcium influx essential for RAB18 gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* 483, 67-70.
- 192. GHOSHROY S., FREEDMAN K., LARTEY R., CITOVSKY V. (1998): Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. *Plant J.* 13(5):591-602.
- 193. GIANAZZA E., WAIT R., SOZZI A., REGONDI S., SACO D., LABRA M., AGRADI E. (2007): Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 59, 179–187.
- 194. GILL B.S., APPELS R., BOTHA-OBERHOLSTER A.M., BUELL C.R., BENNETZEN J.L. et al. (2004): A workshop report on wheat genome sequencing international genome research on wheat consortium. *Genetics* 168:1087–1096.
- 195. GLAZEBROOK J. (2001): Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* 2001 status. *Curr Op Plant Biol* 4: 301-308.
- 196. GLAZEBROOK J., CHEN W.J., ESTES B., CHANG H-S., NAWRATH C., MÉTRAUX J-P., ZHU T., KATAGIRI F. (2003): Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. Plant J 34:217-228.
- 197. GMO Safety (2009): Transgenic fungus-resistant barley effects on pathogenic and beneficial fungi (project: 2005 2008) University of Giessen, Institute of Phytopathology and Applied Zoology http://www.gmo-safety.eu/en/safety\_science/165.docu.html (Utolsó frissítés: 2009. 03. 03.)
- 198. GOFF S.A., RICKE D., LAN T.H., ET AL. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296(5565):92-100.
- 199. GOODAY G.W. (1990): The ecology of chitin degradation. Adv Microbiol Ecol 11: 387-430.
- 200. GOYEAU H., HALKETT F., ZAPATER M.F., CARLIER J., LANNOU C. (2007): Clonality and host selection in wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genet Biol* 44:474-483.
- 201. GÖRLACH J., VOLRATH S., KNAUF-BEITER G., HENGY G., BECKHOVE U., KOGEL K.H., OOSTENDORP M., STAUB T., WARD E., KESSMANN H., RYALS J. (1996): Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- 202. GREEN T.R., RYAN C.A. (1972): Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- 203. GREGERSEN P.L., THORDAL-CHRISTENSEN H., FOERSTER H., COLLINGE D.B. (1997): Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis f.sp. hordei. Physiol Mol Plant Pathol* 51, 85-97.
- 204. GRENIER J., POTVIN C., TRUDEL J., ASSELIN A. (1999): Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. *The Plant Journal* 19(4):473-80.
- 205. GRIGNON C., SENTENAC H. (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:103-128.
- 206. GULTYAEVA E., WALTHER D., KOPAHNKE D., MIKACHAILOVA L. (2000): Virulence of Puccinia recondita Rob. × Desm. f. sp. tritici in Germany and European part of Russia in 1996-1999. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 35(1-4): 409-412.
- 207. GUO T.R., ZHANG G.P., ZHOU M.X., WU F.B., CHEN J.X. (2007): Influence of aluminum and cadmium stresses on mineral nutrition and root exudates in two barley cultivars. *Pedosphere* 17(4): 505–512.
- 208. GUO Y., SONG Y. (2009): Differential proteomic analysis of apoplastic proteins during initial phase of salt stress in rice. *Plant Signaling & Behavior* 4 (2), 121-122.
- 209. GUPTA R. (2001): 2001.Prediction of glycosylation sites in proteomes: from post-translational modifications to protein function. *Ph.D. thesis, CBS Technical University of Denmark, Center for Biological Sequence Analysis* (CBS).
- 210. GUPTA R., HUANG Y., KIEBER J., LUAN S. (1998): Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 16: 581–589.
- 211. GUPTA R., JUNG E., BRUNAK S. (2004): Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. (In preparation)
- 212. GUPTA, R., BRUNAK S. (2002): Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* 7:310-322.
- 213. GYGI S.P., AEBERSOLD R. (2000): Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 4:489–494.
- 214. HAJDUCH M., RAKWAL R., AGRAWAL G.K., YONEKURA M., PRETOVA A. (2001): High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stressrelated proteins. *Electrophoresis* 22(13):2824-31.
- 215. HAJHEIDARI M., EIVAZI A., BUCHANAN B.B., WONG J.H., MAJIDI I., SALEKDEH G.H. (2007): Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Proteome Research* 6:1451-1460.
- 216. HALL J.L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J Exp Bot 53, 1-11.
- 217. HAMMAMI R., HAMIDA J.B., VERGOTEN G., FLISS I. (2009): PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37, Database issue D963–D968 doi:10.1093/nar/gkn655
- 218. HAMMOND-KOSACK K.E., JONES J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 773–791.
- 219. HAMMOND-KOSACK K.E., KANYUKA K. (2007): Resistance genes (*R* genes) in plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester http://www.els.net/ [DOI: 10.1002/9780470015902.a0020119]
- 220. HAMMOND-KOSACK K.E., PARKER J.E. (2003): Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14:177–193
- 221. HARRISON M.J. (1999): Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. *Journal of Experimental Botany* 50:1013-1022.
- 222. HARTUNG W., JESCHKE W.D. (1999): Abscisic acid a long distance stress signal in salt-stressed plants. In: Lerner, ed. Plant responses to environmental stresses: from phytohormone to genome reorganisation. New York: Marcel Dekker Inc., 333–348.
- 223. HARTUNG W., SAUTER A., HOSE E. (2002): Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot.* 53(366):27-32.

- 224. HARTUNG W., WEILER E.W., RADIN J.W. (1992) Auxin and cytokinins in the apoplasmic solution of dehydrated cotton leaves. *J Plant Physiol* 140: 324–327
- 225. HASHIMOTO M., KOMATSU S. (2007): Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress *Proteomics* 7, 1293–1302.
- 226. HASLAM R.P., DOWNIE A.L., RAVENTON M., GALLARDO K., JOB D., PALLETT K.E., JOHN P., PARRY M.A.J., COLEMAN J.O.D. (2003): The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches. *Ann Appl Biol* 143: 81-91.
- 227. HASSAN F. (2006): Heterologous expression of a Recombinant Chitinase from Streptomyces olivaceoviridis ATCC 11238 in transgenic Pea. (Pisum sativum L.) PhD Thesis. Universitat Hannover.
- 228. HAWES M., CELOY R., PRICE I., WEN F., EBOLO J. (2007): Galactose from the legume root cap: Structure, signal, toxin, trigger? Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 146 (4), Suppl. 1, S276.
- 229. HEGEDÜS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (2001): Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160(6), 1085-1093.
- 230. HEIL M., BALDWIN I.T. (2002): Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7: 61–67.
- 231. HEJGAARD J., JACOBSEN S., SVENDSEN I. (1991):Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain *FEBS Lett* 291 (1), 127-131.
- 232. HELLEBOID S, BAUW G, BELINGHERI L, VASSEUR J, HILBERT JL. (1998): Extracellular β-1,3glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium. Planta* 205(1):56-63.
- 233. HENRISSAT B. (1991): A classification of glycosyl-hydrolases based on amino acid sequence similarity. Biochem J 280: 309-316.
- 234. HENSEL G., Kunze G., Kune L. (1999): Expression of the tobacco gene CBP20 in response to developmental stage, wounding, salicylic acid and heavy metals. *Plant Sci* 148:165-174.
- 235. HERMAN E.M., ROTTE K., PREMAKUMAR R., ELWINGER G., BAE R., EHLER-KING L., CHEN S., LIVINGSTON D.P. (2006): Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3 °C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *J Exp Bot* 57(14): 3601-3618.
- 236. HERTIG C., REBMANN G., BULL J., MAUCH F., DUDLER R. (1991): Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol* 16:171-174.
- 237. HIETALA A.M., KVAALEN H., SCHMINDT A., JONK N., SOLHEIM H., FOSSDAL C.G. (2004): Temporal and Spatial Profiles of Chitinase Expression by Norway Spruce in Response to Bark Colonization by Heterobasidion annosum. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 70, No. 7 p. 3948-3953
- 238. HIGA-NISHIYAMA A., OHSATO S., BANNO S., WOO S. H., FUJIMURA M., YAMAGUCHI I. AND KIMURA M. (2006): Cloning and characterization of six highly similar endo-1,3-β-glucanase genes in hexaploid wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 666–673.
- 239. HIGA-NISHIYAMA A., OHSATO S., BANNO S., WOO S.H., FUJIMURA M., YAMAGUCHI I., KIMURA M. (2006): Cloning and characterization of six highly similar endo-1,3-beta-glucanase genes in hexaploid wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 666-73.
- HINCHA D.K., MEINS F. JR, SCHMITT J.M. (1997): β-1,3-Glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol* 114:1077-1083.
- 241. HINTON DM, PRESSEY R. (1980): Glucanase in fruits and vegetables. J Amer Soc Hort Sci 105:499-502.
- 242. HIRANO Y., TSUMURAYA Y., HASHIMOTO Y. (1994): Characterization of spinach leaf alpha-Larabinofuranosidases and beta-galactosidases and their synergistic action on an endogenous arabinogalactanprotein. *Physiologia Plantarum* 92 (2): 286-296.
- 243. HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. (2000): Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins What Do They Have in Common? *Int Arch Allergy Immunol* 122(3):155-166.
- 244. HØJ P.B., FINCHER G.B. (1995): Molecular evolution of plant beta-glucan endohydrolases. *Plant J.* 7:367-379.

- 245. HØJ P.B., HARTMAN D.J., MORRICE N.A., DOAN D.N., FINCHER G.B. (1989): Purification of (1-->3)beta-glucan endohydrolase isoenzyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. *Plant Mol Biol* 13(1):31-42.
- 246. HOLDEN D.W., ROHRINGER R. (1985a): Peroxidases and glycosidases in intercellular fluids from noninoculated and rust-affected wheat leaves. *Plant Physiol* Nov 79 (3): 820-824.
- 247. HOLDEN D.W., ROHRINGER R. (1985b): Proteins in Intercellular Washing Fluid from Noninoculated and Rust-Affected Leaves of Wheat and Barley. *Plant Physiol* 78, 715-723
- 248. HORST W.J. (2007): The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158 (5):419-428
- 249. HORVÁTHNÉ SZANICS E. (2007): Proteomikai módszerek alkalmazása különböző eredetű fehérjék vizsgálatára. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola.
- 250. HSU F.C., BENNETT A.B., SPANSWICK R.M. (1984): Concentrations of Sucrose and Nitrogenous Compounds in the Apoplast of Developing Soybean Seed Coats and Embryos. *Plant Physiol* 75(1): 181–186.
- 251. HU G., RIJKENBERG F.H.J. (1998): Subcellular localization of b-1,3-glucanase in *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*-infected wheat leaves. *Planta* 204 (3), 324-334.
- 252. HUANG J.-C. (2008): Metabolic aspects of the early response of leaf rust-infected wheat. Doktori (PhD) értekezés. Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Plant Sciences, University of the Free State Bloemfontein, South Africa
- 253. HUANG L., BROOKS S.A., LI W., FELLERS J.P., TRICK H.N., GILL B.S. (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of wheat. *Genetics* 164, 655–664.
- 254. HUERTA L., FORMENT J., GADEA J., FAGOAGA C., PEÑA L., PÉREZ AMADOR M.A., GARCÍA MARTÍNEZ, J.L. (2008): Gene expression analysis in citrus reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. *Plant, Cell & Environment* 31(11): 1620-1633.
- 255. HUO C.M., ZHAO B.C., GE R.C., SHEN Y.Z., HUANG Z.J. (2004): Proteomic analysis of the salt tolerance mutant of wheat under salt stress. *Acta genetica Sinica* 12:1408-14.
- 256. HURKMAN W.J., TANAKA C.K. (1996): Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. *Plant Physiology* 111, 735-739.
- 257. HURKMAN W.J., TAO P.H., TANAKA C.K. (1991): Germin-like polypeptides increases in barley roots during salt stress. *Plant Physiology* 97, 366-374.
- 258. HUTTOVÁ J., MISTRÍK I., OLLÉ-SIMONOVIČOVÁ M., TAMÁS L. (2006): Cadmium induced changes in cell wall peroxidase isoenzyme pattern in barley root tips. *Plant Soil Environ* 52 (6): 250-253.
- 259. HYNEK R., SVENSSON B., JENSEN O.N., BARKHOLT V., FINNIE C. (2006): Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone layers by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 5(11):3105-13.
- 260. IAKIMOVA E., KAPCHINA-TOTEVA V., DE JONG A., ATANASSOV A., WOLTERING E. (2005): Involvement of ethylene, oxidative stress and lipid-derived signals in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *BMC Plant Biology* 2005, 5(Suppl 1):S19
- 261. IAKIMOVA E., KAPCHINA-TOTEVA V., DE JONG A., ATANASSOV A., WOLTERING E. (2006): Cadmium-Induced Cell Death in Tomato Suspension Cells is Mediated by Caspase-like proteases, Oxidative Stress and Ethylene. In: Blume Y et al. (Szerk.): *Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxid and Cell Death in Plants.* Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Yalta, Ukraine 8-11. 09. 2004. IOS Press, Amsterdam, 2006.
- 262. ICDA INTERNATIONAL CADMIUM ASSOCIATION (2009): Cadmium Products The Issues and Answers. 4. Cadmium Exposure and Human Health 4.3 Human Health Effects of Cadmium. http://www.cadmium.org/download/Cadmium.doc illetve http://www.cadmium.org/env\_emi.html, legutolsó frissítés: 2010. jan. 31. 21:50:24 GMT
- 263. IDEKER T., GALITSKI T., HOOD L. (2001): A NEW APPROACH TO DECODING LIFE: Systems Biology. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2:343-372.
- IGLESIAS N., ABELENDA J.A., RODINO M., SAMPEDRO J., REVILLA G., ZARRA I. (2005): Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology 47(21): 55-63.

- 265. IGNATIUS S.M.J., CHOPRA R.K., MUTHUKRISHNAN S. (1994) Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and b-1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley. *Physiol Plant* 90:584– 592
- 266. IL S.O., AE R.P., MIN S.B., SUN J.K., YOUNG S.K., JI E.L., NA Y.K., SUMIN L., HYEONSOOK C., OHKMAE K.P. (2005): Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola. Plant Cell*; 17:2832-47
- 267. INCAMPS A., HELY-JOLY F., CHAGVARDIEFF P., RAMBOURG J.C. et al. (2005): Industrial process proteomics: Alfalfa protein patterns during wet fractionation processing. *Biotechnology and Bioengineering* 91(4):447–459.
- 268. INOUE H., NOJIMA H., OKAYAMA H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96 (3): 23-28.
- 269. ISHIDA H., MAKINO A., MAE T. (1999): Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J Biol Chem* 274: 5222–5226
- 270. ISHIDA H., NISHIMORI T., SUGISAWA M., MAKINO A., MAE T. (1997): The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* 38: 471–479
- 271. ISLAM N., TSUJIMOTO H., HIRANO H. (2003a): Wheat proteomics: relationship between fine chromosome deletion and protein expression. *Proteomics* 3(3):307-16.
- 272. ISLAM N., TSUJIMOTO H., HIRANO H. (2003b): Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interaction in protein expression. *Proteomics* 3(4):549-57.
- 273. ISLAM N., WOO S.-H., TSUJIMOTO H., KAWASAKI H., HIRANO H. (2002): Proteome approaches to characterize seed storage proteins related to ditelocentric chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.), *Proteomics* 2, 1146–1155.
- 274. JAMET E., BOUDART G., BORDERIES G., CHARMONT S., LAFITTE C., ROSSIGNOL M., CANUT H., PONT-LEZICA R. (2008): Isolation of plant cell wall proteins. *Methods Mol Biol*, 425: 187-201.
- 275. JAMET E., CANUT H., BOUDART G., PONT-LEZICA R.F. (2006): Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11: 33-39.
- 276. JAYASANKAR S., LI Z., GRAY D.J. (2003): Constitutive expression of Vitis vinifera thaumatin-like protein after in vitro selection and its role in anthracnose resistance. *Functional Plant Biology* 30(11):1105—1115.
- 277. JIANG F, HARTUNG W. (2008): Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot*.59(1):37-43.
- 278. JIANG R.F., MA D.Y., ZHAO F.J. MCGRATH S.P. (2005): Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi* caerulescens from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*), New Phytol 167, 805–813.
- 279. JIN W, HORNER HT, PALMER RG, SHOEMAKER RC. (1999): Analysis and mapping of gene families encoding beta-1,3-glucanases of soybean. *Genetics* 153:445-452.
- 280. JÓCSÁK I., DROPPA M., HORVÁTH G., BÓKA K., VOZÁRY E. (2010): Cadmium- and Flooding-Induced Anoxia Stresses in Pea Roots was Measured by Electrical Impedance. *Zeitschrift für Naturforschung C* (in press)
- 281. JOHNSON L.B., CUNNINGHAM B.A. (1972): Peroxidase activity in healthy and leaf-rust-infected wheat leaves *Phytochemistry*, 11, (2,) 547-551
- 282. JOLLÈS P., MUZZARELLI R.A.A. (Eds.) (1999): Chitin and chitinases. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- 283. JONAK C., NAKAGAMI H., HIRT H. (2004): Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol* 36:3276–3283.
- JUNG J., MAUREL S., FRITIG B., HAHNE G. (1995): Different pathogenesis-related-proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. *J Plant Physiol* 145:153–160.
- 285. JUNG Y.-H., RAKWAL R., AGRAWAL G.K., SHIBATO J., KIM J.-A., LEE M. O., CHOI P.-K., JUNG S.-H., KIM S. H., KOH H. -J., YONEKURA M.; IWAHASHI H., JWA N.-S. (2006): Differential expression of defense/stress-related marker proteins in leaves of a unique rice blast lesion mimic mutant (blm). *Journal of proteome research* 5(10):2586-98.

- 286. JUNG Y-H., JEONG S-H., KIM S.H., SINGH R., LEE J-E., CHO Y-S., AGRAWAL G.K., RAKWAL R., JWA N-S. (2008): Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspension-cultured cells: Workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. J Proteome Res 7: 5187-5210.
- 287. KABAI M. (2008): Apoplasztikus endo-1,3-β-D-glükozidáz aktivitásának vizsgálata levélrozsdával fertőzött fogékony és ellenálló búzavonalakban. (Diplomamunka) Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
- 288. KAMAL A.H.M., KIM K.-H., SHIN D.-H. ET AL. (2009): Proteomics profile of pre-harvest sprouting wheat by using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Plant Omics* 2(3):110-119.
- 289. KATAOKA T., FURUKAWA J., NAKANISHI T.M. (2003): The decrease of extracted apoplast protein in soybean root tip by aluminimum treatment. *Biol Plant* 36, 445-449.
- 290. KEMP G., BOTHA A-M., KLOPPERS F.J., PRETORIUS Z.A. (1999): Disease development and β-1,3glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (1): 45-52.
- 291. KERSEY P., APWEILER R. (2006): Linking publication, gene and protein data. *Nature Cell Biology* 8, 1183 1189.
- 292. KHAN R.R., BARIANA H.S., DHOLAKIA B.B., NAIK S.V., LAGU M.D., RATHJEN A.J., BHAVANI S., GUPTA V.S. (2005): Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat. *Theor Appl Genet* 111(5):846-50.
- 293. KHURI S., BAKKER F.T., DUNWELL J.M. (2001): Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol Biol Evol* 18(4):593-605.
- 294. KIBBE W.A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35 (suppl\_2): W43-W46.
- 295. KIEFFER P., DOMMES J., HOFFMANN L., HAUSMAN J.F., RENAUT J. (2008): Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8 (12): 2514-2530.
- 296. KIEFFER P., SCHRÖDER P., DOMMES J., HOFFMANN L., RENAUT J., HAUSMAN J-F. (2009): Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics* 72(3):379-396.
- 297. KIM D.Y., BOVET L., MAESHIMA M., MARTINOIA E., LEE Y. (2007): The ABC transporter of *A. thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* 47, 309-318.
- 298. KIM S.T., CHO K.S., YU S., KIM S.G., HONG J.C., HAN C.-D., BAE D.W., NAM M.H., KANG, K.Y. (2003): Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368–2378.
- 299. KIM S.T., KIM S.G., HWANG D.H., KANG S.Y., KIM H.J., LEE B.H., LEE J.J., KANG K Y. (2004): Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea. Proteomics* 4: 3569–3578.
- 300. KIM ST, CHIO KS, JANG YS, KANG KY (2001): Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22: 2103-2109.
- 301. KIMURA M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- KIRÁLY Z. (2008): A hazai rozsdabetegégek kutatása és a rezisztencianemesítés. Növényvédelem 44 (7): 309-313.
- 303. KITAMURA E., KAMEI Y. (2006): Molecular cloning of the gene encoding beta-1,3(4)-glucanase A from a marine bacterium, Pseudomonas sp. PE2, an essential enzyme for the degradation of *Pythium porphyrae* cell walls. *Appl Microbiol Biotechnol* 71(5):630-7.
- 304. KLEMENT Z. (2004): Védekezési mechanizmusok az élővilágban. Magyar Tudomány 2004/10 p. 1108
- KOLLER A., WASHBURN M.P., LANGE B.M., ANDON N.L. et al. (2002): Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Nat Acad Sci* 99, 11969–11974.
- 306. KOLMER J.A. (1996): Genetics of resistance to Wheat Leaf Rust. Annu Rev Phytopathol 34: 435-455.
- KOLMER J.A. (1997): Virulence in Puccinia recondita f. sp. tritici isolates from Canada to genes for adultplant resistance to wheat leaf rust. *Plant Disease* 81:267-271.

- 308. KOLMER J.A. (2005): Tracking wheat rust on a continental scale. Curr Opin Plant Biol 8(4):441-449.
- 309. KOMBRINK E., SCHRODER M., HAHLBROCK K. (1988): Several pathogenesis-related proteins in potato are β-1,3-glucanases and chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 782–786
- KONNO H., YAMASAKI Y., SUGIMOTO M., TAKEDA K. (2008): Differential changes in cell wall matrix polysaccharides and glycoside-hydrolyzing enzymes in developing wheat seedlings differing in drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165 (7):745-754.
- 311. KOORNNEEF A., PIETERSE C.M.J. (2008): Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146, 839–844.
- *312.* KOSEGARTEN H, GROLIG F, ESCH A, GLUESENKAMP KH, MENGEL K. (1999): Effects of NH4<sup>+</sup>, NO3<sup>-</sup> and HCO3<sup>-</sup> on apoplast pH in the outer cortex of root zones of maize, as measured by the fluorescence ratio of fluorescein boronic acid. *Planta* 209: 444-452.
- 313. KOTAKE T, TSUCHIYA K, AOHARA T, KONISHI T, KANEKO S, IGARASHI K, SAMEJIMA M, TSUMURAYA Y. (2006): An alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase from immature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). J Exp Bot 57(10):2353-2362.
- 314. KOVALCHUK I., TITOV V., HOHN B., KOVALCHUK O. (2005) Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutation Research* 570:149–161
- 315. KÖMÍVES T. (2006): A búza levélrozsda-gombájának és a búzafajták levélrozsdával szembeni ellenállóságának vizsgálata. In: Meskó A. (szerk.). A magyar tudomány a gazdaságért és a társadalomért: A Magyar Köztársaság Kormánya és a Magyar Tudományos Akadémia közötti megállapodás keretében végzett stratégiai kutatások főbb eredményei (2005-2006). Bp. Magyar Tudományos Akadémia. p. 121-128.
- 316. KRABEL D, ESCHRICH W, WIRTH S, WOLF G. (1993): Callase-(1,3-B-D-glucanase) activity during spring reactivation in deciduous trees. *Plant Sci* 93:19-23.
- 317. KRAGH K.M., JACOBSEN S., MIKKELSEN J.D. (1990): Induction, purification and characterization of barley leaf chitinase. *Plant Sci.* 71: 55-68.
- 318. KRÄMER U., TALKE I.N., HANIKENNE M. (2007): Transition metal transport. FEBS Lett 581, 2263-2272.
- 319. KRISHNAVENI S., MUTHUKRISHNAN S., LIANG G.H., WILDE G., MANICKAM A. (1999) Induction of chitinases and β-1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci* 144 (1): 9–16.
- 320. KUMAR S., DUDLEY J., NEI M., TAMURA K. (2008): MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- 321. KUNKEL B.N., BROOKS D.M. (2002): Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 325–331
- 322. KUROSAKI F., TASHIRO N., NISHI A. (1988): Role of chitinase and chitin oligosaccharides in lignification response of cultured carrot cells treated with mycelial walls. *Plant Cell Physiology* 29:527-531.
- 323. KUWABARA C., ARAKAWA K., YOSHIDA S. (1999): Abscisic acid-induced secretory proteins in suspension-cultured cells of winter wheat. *Plant Cell Physiol* 40(2):184-91.
- 324. KUWABARA C., TAKEZAWA D., SHIMADA T., HAMADA T., FUJIKAWA S., ARAKAWA K. (2002): Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiologia Plantarum* 115(1):101-110.
- 325. KUZNIAK E., URBANEK H. (2000): The involvment of hydrogen-peroxide in plant response to stresses. *Acta Physilogiae Plantarum* 22 (2): 195-2003.
- KWON H.K., YOKOYAMA R., NISHITANI K. (2005) A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol* 46, 843-857.
- 327. LABOURÉ A.M., FAIK A., MANDARON P., FALCONET D. (1999): RGD-dependent growth of maize calluses and immunodetection of an integrin-like protein. *FEBS Lett* 442: 123–128.
- 328. LAEMMLI U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.

- LAGRIMINI L.M., BURKHART W., MOYER M., ROTHSTEIN S. (1987): Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissuespecific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7542-7546.
- 330. LAGRIMINI L.M., GINGAS V., FINGER F., ROTHSTEIN S., LIU T.Y. (1997): Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol* 114: 1187–1196.
- 331. LAI D.M., HOJ P.B., FINCHER G.B. (1993): Purification and characterization of (1-->3, 1-->4)-beta-glucan endohydrolases from germinated wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Mol. Biol.* 22 (5), 847-859.
- 332. LAMBAIS M.R., MEHDY M.C. (1998) Spatial distribution of chitinases and b-1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytol* 140, 33–42.
- 333. LARCHER W. (1987): Stress bei Pflanzen. Naturwissenschaften 74: 158-167.
- 334. LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H.\*, VALENTIN F.\*, WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R.\*, THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. (2007): ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- 335. LASOTA E., DMOCHOWSKA M., KAWALEK A., NADOLSKA-ORCZYK A., ORCZYK W. (2009): Construction of subtractive cDNA library and identification of wheat (*Triticum aestivum* L.) transcripts induced by brown rust (*Puccinia triticina*). 19th ITMI / 3rd COST Tritigen Joint Workshop 2009. (Aug.31-Sept.4. Clermont-Ferrand, France) Abstracts p. 166.
- 336. LEAH R., TOMMERUP H., SVENDSEN I., MUNDY J. (1991): Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem* 266(3):1564-73.
- 337. LEASE K.A., WALKER J.C. (2006): The *Arabidopsis* unannotated secreted pepetide database, a resource for lant peptoidomics. *Plant Physiol* 142, 831-838.
- 338. LEE J., FENG J., CAMPBELL K.B, SCHEFFLER B.E., GARRETT W.M., THIBIVILLIERS S., STACEY G., NAIMAN D.Q., TUCKER M.L., PASTOR-CORRALES M.A., COOPER B. (2009): Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. *Mol Cell Proteomics* 8(1):19-31.
- 339. LEE KH, PIAO HL, KIM HY, CHOI SM, JIANG F, HARTUNG W, HWANG ILDOO, KWAK JM, LEE IJ, HWANG INHWAN. (2006): Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126, 1109–1120.
- 340. LEE R.C., BURTON R.A., HRMOVA M., FINCHER G.B. (2001): Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones. *Biochem J.* 356(Pt 1):181-9.
- 341. LEE R.C., HRMOVÁ M., BURTON R.A., LAHNSTEIN J., FINCHER G.B. (2003): Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha -L-arabinofuranosidase and beta -D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. *J Biol Chem* 278(7):5377-87.
- 342. LEE S.J., SARAVANAN R.S., DAMASCENO S.M.B. et al. (2004): Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol Biochem* 42: 979-988.
- 343. LEE, Y.K., HWANG, B.K. (1996): Differential Induction and Accumulation of β-1,3-Glucanase and Chitinase Isoforms in the Intercellular Space and Leaf Tissues of Pepper by Xanthomonas campestris pv. vesicatoria Infection. Journal of Phytopathology 144: 79–87.
- 344. LEUBNER-METZGER G, FRÜNDT C, VÖGELI-LANGE R, MEINS F JR. (1995): Class I β-1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 109:751-759.
- 345. LEUBNER-METZGER G. (2003): Functions and regulation of beta-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci. Res.* **13**:17-34.
- 346. LEUBNER-METZGER G., MEINS F.J.R. (1999): Functions and regulation of plant β-1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (Szerk.): Pathogenesis-related proteins in plants. pp 49-76, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 1999.
- 347. LEVITT J. (1980): Responses of plant to environmental stresses. London: Academic Press. 297 p.
- 348. LI W.L., FARIS J.D., MUTHUKRISHNAN S., LIU D.J., CHEN P.D., GILL B.S. (2001): Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β-1, 3-glucanases from wheat spikes infected by Fusarium graminearum. *Theor Appl Genet* 102: 353–362.

- 349. LI Z.C., MCCLURE J.W. (1990): Soluble and bound apoplastic proteins and isozymes of peroxidase, esterase and malate dehydrogenase in oat primary leaves. *Plant Physiol* 136:398-403.
- 350. LI Z.C., MCCLURE J.W., HAGERMAN A.E. (1989): Soluble and bound apoplasmic activity for peroxidase, β-D-glucosidase, malate dehydrogenase and nonspecific arylesterase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. *Plant Physiol* 190: 185–190.
- 351. LIAO Y.C., KREUZALER F., FISCHER R., REISENER H.J., TIBURZY R. (1994): Characterization of a wheat class Ib chitinase gene differentially induced in isogenic lines by infection with *Puccinia graminis*. *Plant Sci* 103: 177-187.
- 352. LIMPERT E., FINCKH M.R., WOLFE M.S. (1996): Population studies of airborne pathogens on cereals as a means of improving strategies for disease control – integrated control of cereal mildews and rusts: towards coordination of research across Europe. Eur 16884 – COST 817, Official publications of European Communities. Luxembourg.
- 353. LIN K.C., BUSHNELL W.R., SMITH A.G., SZABO L.J. (1998): Temporal accumulation patterns of defense response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:95-114.
- 354. LIN R., WANG X., LUO Y., DU W., GUO H., YIN D. (2007): Effects of soil cadmium in growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69, 89-98.
- 355. LINTHORST H.J.M., VAN LOON L.C. (1991): Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10 (2): 123-150.
- 356. LISZKAY A., KENK B., SCHOPFER P. (2003): Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217, 658–667.
- 357. LIU D., RAGHOTHAMA K.G., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1994): Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 1888–1892.
- 358. LIU G., SHENG X., GREENSHIELDS D.L., OGIEGLO A., KAMINSKYJ S., SELVARAJ G., WEI,Y. (2005): Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18 (7): 730-741.
- 359. LOHAUS G., PENNEWISS K., SATTELMACHER B., HUSSMANN M., MÜHLING K.H. (2001): Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* 111 (4):457-465.
- LÓPEZ-MILLÁN A.F., MORALES F., ABADÍA A., ABADÍA J. (2000): Effects of Iron Deficiency on the Composition of the Leaf Apoplastic Fluid and Xylem Sap in Sugar Beet. Implications for Iron and Carbon Transport. *Plant Physiology* 124, 873–884.
- LOTAN T, ORI N, FLUHR R. (1989): Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1:881-887.
- 362. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193(1): 265–75.
- 363. LU G., MORIYAMA E.N. (2004): Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in bioinformatics* 5(4):378-88.
- 364. LUWE M.W.F., TAKAHAMA V., HEBER V. (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* 101, 969–976.
- MAJERAN W., CAI Y., VAN WIJK K.J. (2005): Functional Differentiation of Bundle Sheath and Mesophyll Maize Chloroplasts Determined by Comparative Proteomics. *Plant Cell* 17, 3111–3140.
- 366. MAJOUL T., BANCEL E., TRIBOÏ E., BEN HAMIDA J., BRANLARD G. (2003): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics* 3: 175–183.
- 367. MAKINO A., MAE T., OHIRA K. (1984) Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant Cell Physiol* 25, 429–437.
- 368. MAKSYMIEC W. (2007): Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(3): 177-187.
- 369. MANNINGER K. (2000): Virulence survey of wheat leaf rust in Hungary: Races/pathotypes in 1999. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 35(1-4): 421-428.

- 370. MANNINGER S.né (1991): A hazai búzarozsdák fiziológiai specializálódásának tanulmányozása 1955 és 1989 között. *Növényvédelem* 6 (27): 250-255.
- 371. MANNINGER S.NÉ (2008): Búzán előforduló rozsdagombák virulenciaváltozásai Magyarországon. *Növényvédelem* 44 (7),:328-332.
- 372. MARCH T.J., ABLE J.A., SCHULTZ C.J., ABLE A.J. (2007): A novel late embryogenesis abundant protein and peroxidase associated with black point in barley grains. *Proteomics* 7 (20):3800-3808.
- 373. MARENTS E.M., GRIFFITH M., MLYNARZ A., BRUSH R.A. (1993): Protein accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimatation. *Physiol Plant* 87, 499-507.
- MARGIS-PINHERO M., MARTIN C., DIDERJEAN L., BURKARD G. (1993): Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. *Plant Mol Biol* 22:659–668.
- 375. MARRS K.A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 127-158.
- 376. MARRS K.A., WALBOT V. (1997): Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol* 113(1): 93–102.
- 377. MARSHALL J.G., DUMBROFF E.B., THATCHER B.J., MARTIN B., RUTLEDGE R.G., BLUMWALD E. (1999): Synthesis and oxidative insolubilization of a boron-polysaccharide complex from radish root. *Planta* 208, 401-408.
- MATHESON N.K., SAINI H.S. (1977): a-L-Arabinofuranosidases and beta-D-galactosidases in germinatinglupin cotyledons. *Carbohydr Res* 57, 103-116.
- 379. MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. (1996): Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci* USA 93(15):7623-7.
- 380. MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. (2006): Peptide hormones in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 649-674.
- MAUCH F., DUDLER R. (1993): Differential Induction of Distinct Glutathione-S-Transferases of Wheat by Xenobiotics and by Pathogen Attack. *Plant Physiol* 102, 1193-1201.
- 382. MAUCH F., HADWIGER L.A., BOLLER T. (1988): Antifungal hydrolases in Pea tissue. Purification and characterization of two chitinases and two β-1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol* 87, 325-333.
- 383. MAUCH-MANI B., MAUCH F. (2005): The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8, 409–414.
- 384. MAYER R.T., SHAPIRO J.P., BERDIS E., HEARN C.J., MCCOLLUM T.G., MCDONALD R.E., DOOSTDAR H. (1995): Citrus rootstock responses to herbivory by larvae of the sugarcane rootstock borer weevil (*Diaprepes abbreviatus*). *Physiol Plant* 94 (1): 164-173.
- 385. MCINTOSH R.A. (1998). Breeding wheat for resistance to biotic stress. *Euphytica* 100, 19-34.
- 386. MCINTOSH R.A., YAMAZAKI Y., DEVOS K.M., DUBCOVSKY J., ROGERS J., MAND APPELS R. (2007) Catalogue of gene symbols for wheat. 2007 Supplement. KOMUGI Integrated Wheat Science Database. Available online at http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp
- McLAUGHLIN M.J., PARKER D.R., CLARKE J.M. (1999): Metals and micronutrients food safety issues. *Field Crops Research* 60, 143-163.
- 388. MEHTA A., BRASILEIRO A.C., SOUZA D.S., ROMANO E., CAMPOS M.A., GROSSI-DE-SÁ M.F., SILVA M.S., FRANCO O.L., FRAGOSO R.R., BEVITORI R., ROCHA T.L. (2008): Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? *FEBS J* 275 (15): 3731-3746
- 389. MEIKLE P.J., HOOGENRAAD N.J., BONIG I., CLARKE A.E., STONE B.A. (1994): A  $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -bglucan-specific monoclonal antibody and its use int he quantitation and immunocitochemical localization of  $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - $\beta$ -glucans. *The Plant Journal* 5(1): 1-9.
- 390. MEIKLE PJ, BONIG I, HOOGENRAAD NJ, CLARKE AE, STONE BA. (1991): The location of (1-3)-ßglucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1-3)-ßglucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185:1-8.
- 391. MELCHERS L.S., APOTHEKER-DE GROOT M., VAN DER KNAAP J.A., PONSTEIN A.S., SELA-BUURLAGE M.B., BOL J.F., CORNELISSEN B.J.C., VAN DEN ELZEN P.J.M., LINTHORST H.J.M.

(1994): A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J* 5, 469-480.

- 392. MEMBRE N., BERNIER F. (1998): The rice genome expresses at least six different genes for oxalate oxidase/germin-like proteins (Accession Nos. AF032971, AF032972, AF032973, AF032974, AF032975, and AF032976) (PGR98-021) *Plant Physiol* 116 (2), 868.
- 393. MESKIENE I., BÖGRE L., GLASER W., BALOG J., BRANDSTÖTTER M., ZWERGER K., AMMERER G., HIRT H. (1998): MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogenactivated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1938–1943.
- 394. MÉTRAUX J.-P., STREIT L., STAUB T.H. (1988): A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol* 33, 1-9.
- METWALLY A., FINKEMEIER I., GEORGI M., DIETZ K.J. (2003): Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* 132:272–281.
- 396. METWALLY A., SAFRANOVA V.I., BELIMOV A.A., DIETZ K. (2005): Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J Exp Bot* 56(409):167–178.
- 397. MINGEOT D., JACQUEMIN J.M. (1998): A wheat cDNA coding for a thaumatin-like protein reveals a high level of RFLP in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95, 822-827.
- 398. MINIC Z. (2008): Physiological roles of plant glycoside hydrolases. Planta 227(4):723-740.
- 399. MINIC Z., DO C-T., RIHOUEY C., MORIN H., LEROUGE P., JOUANIN L. (2006): Purification, functional characterization, cloning and identification of mutants of a seed specific arabinan hydrolase in *Arabidopsis. J Exp Bot* 57,2339-2351.
- 400. MINIC Z., JAMET E., NÉGRONI L., ARSENE DER GARABEDIAN P., ZIVY M., JOUANIN L. (2007): A sub-proteome of Arabidopsis thaliana mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. J Exp Bot 58(10):2503-12.
- 401. MINIC Z., JOUANIN L. (2006): Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44,435–449.
- 402. MISAS-VILLAMIL J.C., VAN DER HOORN R.A.L. (2008): Enzyme-inhibitor interactions at the plantpathogen interface. *Curr Op Plant Biol* 11,1-9.
- MITSUNAGA T., IWASE M., YUKI D., KOGA D. (2004): Intracellular Localization of a Class IV Chitinase from Yam. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68 (7):1518-1524.
- 404. MITTRA, B., GHOSH, P., HENRY, S.L., MISHRA, J., DAS, T.K., GHOSH, S., BABU, C.R., MOHANTY, P. (2004): Novel mode of resistance to *Fusarium* infection by mild dose pre-exposure of cadmium to wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 781–787.
- 405. MOHAMMADI M., ROOHPARVAR R., TORABI M. (2001): Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of Puccinia striiformis f. sp. tritici, the causal agent of yellow rust disease. *Mycopathologia* 154: 119–126, 2001.
- 406. MOLANO J., POLACHECK I., DURAN A., CABIB E. (1979): An endochitinase from wheat germ. Activity on nascent and preformed chitin. J. Biol. Chem. 254: 4901-4907.
- 407. MONTANINI B., BLAUDEZ D., JEANDROZ S., SANDERS D., CHALOT M. (2007): Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 23, 107.
- 408. MOONS A. (2005): Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione Stransferases (GSTs). *Vitam Horm* 72, 155-202.
- 409. MOSHER R.A., DURRANT W.E., WANG D., SONG J., DONG X. (2006): A comprehensive structurefunction analysis of Arabidopsis SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *The Plant Cell* 18, 1750-1765.
- 410. MOURADOV A, MOURADOVA E, SCOTT KJ. (1994): Gene family encoding basic pathogenesis-related 1 proteins in barley. *Plant Mol Biol* 26(1):503-507.
- 411. MUTHUKRISHNAN S., LIANG G.H., TRICK H.N., GILL B.S. (2001): Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:93-114.

- 412. NAKAMURA K., TSUMURAYA Y., HASHIMOTO Y., YAMAMOTO S. (1984): Arabinogalactan-proteins reacting with eel anti-H agglutinin from leaves of cruciferous plants. *Agric Biol Chem* 48, 753-760.
- 413. NAKANO R., ISHIDA H., MAKINO A., MAE T. (2006): In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiol* 47, 270–276.
- 414. NAKASHITA H., YASUDA M., NITTA T., ASAMI T., FUJIOKA S., ARAI Y., SEKIMATA K., TAKATSUTO S., YAMAGUCHI I., YOSHIDA S. (2003): Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33, 887–898.
- 415. NASSER W., DE TAPIA M., KAUFMANN S., MONTASSER-KOUSHARI S., BURKARD G. (1988): Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. *Plant Mol Biol* 11:529–538.
- 416. NATARAJAN S., XU C., CAPERNA T.J., GARRET W.M. (2005): Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry* 342: 214–220.
- 417. NAVARRE D.A., WOLPERT T.J. (1999): Victorin induction of an apoptotic, senescence-like response in oats. *The Plant Cell* 11:237–250.
- 418. NAVARRO L., BARI R., ACHARD P., LISON P., NEMRI A., HARBERD N.P., JONES J.D. (2008): DELLAs control plant immune responses by modulation of salicylic acid-jasmonic acid antagonism. *Current Biology* 18, 650-655.
- 419. NAVARRO L., DUNOYER P., JAY F., ARNOLD B., DHARMASIRI N., ESTELLE M., VOINNET O., JONES J.D.G. (2006): A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439.
- 420. NEUHOFF V., STAMM R., ELBL H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427-448.
- 421. NEVO Y., NELSON N. (2006): The NRAMP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 1763, 609-620.
- 422. NIDERMAN T., GENETET I., BRUYERE T. ET AL. (1995): Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14 kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*. 108: 17–27.
- 423. NIELSEN H., ENGELBRECHT J., BRUNAK S., VON HEIJNE G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- 424. NIELSEN K.H., SCHJOERRING J.K. (1998): Regulation of apoalstic NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration in leaves of oilsseed rape. *Plant Physiol* 118, 1361-1368.
- 425. NIILER E. (2000): Monsanto releases rice data to academia. Nature Biotechnology 18: 484.
- 426. NISHIZAWA Y., SARUTA M., NAKAZONO K., NISHIO Z., SOMA M., YOSHIDA T., NAKAJIMA E., HIBI T. (2003): Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible beta-glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol Biol*. 51(1):143-52.
- 427. NOCENTE F., GAZZA L., PASQUINI M. (2007): Evaluation of leaf rust resistance genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr47* and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection. *Euphytica* 155(3): 329-336.
- 428. NÜRNBERGER T., KEMMERLING B. (2009): Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMPtriggered immunity. *Annu Plant Rev* 34, 16-47.
- 429. OBERT D.E., FRITZ A.K., MORAN J.L., SINGH S., RUDD J.C., MENZ M.A. (2005): Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat. *Theoretical and applied genetics* 110 (8): 1439-1444.
- 430. OGIHARA Y. ISONO K. KOJIMA T. ET AL.(2000):Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: complete sequence and contig clones. *Plant Mol Biol Rep* 18:243-253.
- 431. OH I.S., PARK A.R., BAE M.S., KWON S.J., KIM Y.S., LEE J.E., KANG N.Y., LEE S., CHEONG H., PARK O.K. (2005): Secretome Analysis Reveals an *Arabidopsis* Lipase Involved in Defense against *Alternaria brassicicola. Plant Cell* 17(10): 2832–2847.
- 432. OKUSHIMA Y., KOIZUMI N., KUSANO T., SANO H. (2000): Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* 42, 479-488.

- 433. ORI N, SESSA G, LOTAN T, HIMMELHOCH S, FLUHR R. (1990): A major stylar matrix polypeptide (Sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J* 9(11):3429-3436.
- 434. OSMOND R.I.W. (2000): Barley family five pathogenesis-related proteins. Thesis (Ph.D.) University of Adelaide, Dept. of Plant Science, 2000
- 435. OSMOND R.I.W., HRMOVA M., BURTON R.A., FINCHER G.B. (1998): Thaumatin-like proteins from barley (Hordeum vulgare). *Proceedings of the 42nd Ann. Aust. Society Biochem. Mol. Biol. Conference, Adelaide, 28 September 1 October, 1998.*
- 436. OSMOND R.I.W., HRMOVA M., FONTAINE F., IMBERTY A., FINCHER G.B. (2001): Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)-β-D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *Eur J Biochem* 268, 4190-4199.
- 437. ØSTERGAARD O., FINNIE C., LAUGESEN S., ROEPSTORFF P., SVENNSON B. (2004): Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4-7). *Proteomics* 4(8):2437-47.
- 438. ØSTERGAARD O., MELCHIOR S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2002): Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt. *Proteomics* 2(6):733-9.
- 439. OWCZARZY R., TATAUROV A.V., WU Y., MANTHEY J.A., MCQUISTEN K.A., ALMABRAZI H.G., PEDERSEN K.F., LIN Y., GARRETSON J., MCENTAGGART N.O. et al. (2008): IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res* 36(suppl\_2): W163-W169.
- 440. PÁL M., HORVÁTH E., JANDA T., PÁLDI E., SZALAI G. (2005): Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. *Physiol. Plant* 125, 356–364.
- 441. PÁL M., HORVÁTH E., JANDA T., PÁLDI E., SZALAI G. (2006): Physiological changes and defense mecganiisms induced by cadmium in maize. *J Plant Nutr Soil Sci* 169, 239-246.
- 442. PALOMARES O., ALCÁNTARA M., QUIRALTE J., VILLALBA M., GARZÓN F., RODRÍGUEZ R. (March 2008). Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker. *N Engl J Med* 358 (12): 1306–1308.
- 443. PAN S.Q., YE X.S., KUC J. (1992): Induction of chitinases in tobacco plants systematically protected against blue mold by Peronospora tabacian or tobacco mosaic virus. *Phytopathol* 82, 119-123.
- 444. PARK S-C., LEE J.R., KIM J-Y., HWANG I., NAH J-W., CHEONG H., PARK Y., HAHM K-S. (2010): Pr-1, a novel antifungal protein from pumpkin rinds. *Biotechnology Letters* 32 (1):125-130.
- 445. PARKHURST D.F. (1982) Stereological methods for measuring internal leaf structural variables. *Am J Bot* 69, 31–39.
- 446. PAYNE G., AHL P., MOYER M., HARPER A., BECK J., MEINS F.J.R., RYALS J. (1990): Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87, 98-102.
- 447. PERFUS-BARBEOCH L., LEONHARDT N., VAVADDEUR A., FORESTIER C. (2002): Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32, 539-548.
- 448. PIERROT H, VAN WIELINK JE (1977) Localization of glycosidases in the wall of living cells from cultured Convolvulus arvensis tissue. *Planta* 137, 235-242.
- 449. PIGNOCCHI C., FOYER C.H. (2003): Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Op Plant Biol* 6, 379-389.
- 450. PINEDO M.L., SEGARRA C., CONDE R.D. (1993): Occurrence of two endoproteinases in wheat leaf intercellular washing fluid. *Physiol Plant* 88, 287–293.
- 451. PINTO M.P., RICARDO C.P.P. (1995): *Lupinus albus* L. Pathogenesis-Related Proteins That Show Similarity to PR-10 Proteins. *Plant Physiol* 109, 1345-1351.
- 452. POLLE A., CHAKRABARTIK K., SCHUMANN W., RENNENBERG H. (1990): Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway Spruce (*Picea abies* L. Karst). *Plant Physiol* 94, 312–319.
- 453. POLLE A., SCHÜTZENDÜBEL A. (2003): Heavy metal signaling in plants: linking cellular and organismic responses. In: Hirt H, Shinozaki K, (Szerk.) *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg. pp. 187-215

- 454. PORUBLEVA L., VANDER VELDEN K., KOTHARI S., OLIVER D.J., CHITNIS P.R. (2001): The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22: 1724–1738.
- 455. PÓS V., HALÁSZ K., LUKÁCS N., MANNINGER K., JUHÁSZ T., MESTERHÁZI Á., MEDZIHRADSZKY K., HUNYADI-GULYÁS É., CSŐSZ L.NÉ (2005): Proteomic investigation of wheat intercellular washing fluid. Acta Biologica Szegediensis 1-2., 31-32.
- 456. POSCHENRIEDER CH., TOLRA R., BARCELO J. (2006): Can metals defend plants against biotic stress? *TRENDS in Plant Science* 11 (6): 288-295.
- 457. POTTER S., UKNES S., LAWTON K., WINTER A.M., CHANDLER D., DIMAIO J., NOVITZKY R., WARD E., RYALS J. (1993): Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6, 680-685.
- 458. PRASAD M.N.V. (1995a): Inhibition of maize leaf chlorophylls, carotenoids and gas exchange functions by *Cadmium. Photosynthetica* 31, 635–640.
- 459. PRASAD M.N.V. (1995b): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35(4):525-545.
- 460. PUNJA Z.K., ZHANG Y.Y. (1993): Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol* 25:526–540.
- 461. PURNHAUSER L., CSÖSZ M., TAR M., MESTERHÁZY Á. (2008): Molekuláris markerek felhasználása a búza rozsdabetegségekkel szembeni rezisztencianemesítésében. *Növényvédelem* (7):333-339.
- QURESHI M.I., QADIR S., ZOLLA L. (2007): Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of plant physiology* 164(10):1239-1260.
- 463. RAB E. (2008): Búza apoplaszt fehérjék kifejeződésének vizsgálata normál és stressz körülmények között. (Diplomamunka) Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
- 464. RABILLOUD T. (1998): Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-760.
- 465. RAKWAL R., AGRAWAL G., KUBO A., YONEKURA M., TAMOGAMI S., SAJI H., IWAHASHI H. (2003): Defense/stress responses elicited in rice seedlings exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide. *Environ. Exp. Bot.* 49(3): 223-235.
- 466. RAKWAL R., AGRAWAL G.K., YONEKURA M. (1999): Separation of proteins from stressed rice (Oryza sativa L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. *Electrophoresis* 20(17):3472-8.
- 467. RAMANJULU S., KAISER W., DIETZ K.J. (1999): Salt and drought stress differentially affect the accumulation of extracellular protein in barley. *Z Naturforsch* 54, 337-347.
- 468. RAMPITSCH C., BYKOVA N.V., MCCALLUM B., BEIMCIK E., ENS W. (2006): Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics* 6, 1897-1907.
- 469. RANIERI A., CASTAGNA A., SCEBBA F., CARERI M., ZAGNONI I., PREDIERI G., PAGLIARI M., SANITA DI TOPPI L. (2005): Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 45–54.
- 470. RAY S., ANDERSON J.M., URMEEV F.I., GOODWIN S.B. (2003): Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola. Plant Mol. Biol.* 53 (5), 701-714.
- 471. REBMANN G., MAUCH F., DUDLER R., HERTIG C., BULL J. (1991a). "A wheat glutathione-S-transferase gene with transposon-like sequences in the promoter region". *Plant Mol Biol* 16(6):1089–1091.
- 472. REGALADO A.P., RICARDO C.P.P. (1996) Study of the intercellular fluid of healthy *Lupinus albus* organs. Presence of a chitinase and a thaumatin-like protein. *Plant Physiol*. 110(1):227–232.
- 473. REHULKOVÁ H., MARCHETTI-DESCHMANN M., PITTENAUER E., ALLMAIER G., REHULKA P. (2009): Improved identification of hordeins by cysteine alkylation with 2-bromoethylamine, SDS-PAGE and subsequent in-gel tryptic digestion. *J Mass Spectrom* 44(11):1613-21.

- 474. REINBOTHE S., MOLLENHAUER B., REINBOTHE C. (1994): JPIs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* 6, 1197-1209.
- 475. REINBOTHE S., REINBOTHE C., LEHMANN J., PARTHIER B. (1992): Differential accumulaion of methyl-jsmonate-induced mRNAs in response to abscisic acid and desiccation in barley (*Hordeum vulgare*). *Physio. Plant* 86, 49-56.
- 476. REISS E., HORSTMANN C. (2001): *Drechslera teres* Infected Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves Accumulate Eight Isoforms of Thaumatin-like Proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 58, 183-188.
- 477. REMI SHIH N.R., MCDONALD K.A., JACKMAN A.P., GIRBES T., IGLESIAS R. (1997) Bifunctional plant defense enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from Trichosanthes kirilowii cell cultures. *Plant Sci* 130, 145-150.
- 478. REN A., GAO Y., ZHANG L., XIE F. (2006): Effects of cadmium on growth parameters of endophyteinfected endophyte-free ryegrass. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169(6):857-860.
- 479. REPETTO O., BESTEL-CORRE G., DUMAS-GAUDOT E., BERTA G., GIANINAZZI-PEARSON P., GIANINAZZI S. (2004): Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mossae*-inoculate pea roots. *New Phytol* 157, 555-567.
- 480. REQUEJO R., TENA M. (2005): Proteome analysis in maize roots reveals that oxidative stress in a main contributory factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* 66, 1519-1528.
- 481. REYMOND P., FARMER E.E. (1998): Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1, 404-411.
- 482. RIDE J.P., BARBER M.S. (1990): Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. *Plant Science* 71: 185–197.
- 483. RIVERA-BECERRIL F., METWALLY A., MARTIN-LAURENT F., VAN TUINEN D., DIETZ K.J., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V. (2005a): Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum* sativum L. Water Air Soil Pollut 168:71–186.
- 484. RIVERA-BECERRIL F., VAN TUINEN D., MARTIN-LAURENT F., METWALLY A., DIETZ K.J., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V. (2005b): Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16(1):51–60.
- 485. ROBERTS M.R., SALINAS J., COLLINGE D.B. (2002): 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol. Biol.* 50, 1031-1039.
- 486. ROBERTS W.K., SELITRENNIKOFF C.P. (1990): Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136, 1771-1778.
- 487. ROBERTSON D., MITCHELL G.P., GILROY J.S., GERRISH C., BOLWELL G.P., SLABAS A.R. (1997): Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J Biol Chem* 272, 15841-15848.
- 488. RODRIGUEZ-LOPEZ M., BAROJA-FERNANDEZ E., ZANDUETA-CRIADO A., MORENO-BRUNA B., MUNOZ F.J., AKAZAWA T., POZUETA-ROMERO J. (2001) Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (Hordeum vulgare L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein. JOURNAL FEBS Lett 490 (1-2), 44-48.
- 489. ROGGEN HP, STANLEY RG. (1969): Cell wall hydrolyzing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* 84:295-303.
- 490. ROHRINGER R., EBRAHIM-NESBAT F., WOLF G. (1983): Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 34 (149): 589-605.
- 491. ROMERO G.O., SIMMONS C., YANESHITA M., DOAN M., THOMAS B.R., RODRIGUEZ R.L. (1998): Characterization of rice endo-β-glucanase genes (Gns2-Gns14) defines a new subgroup within the gene family. *Gene* 223, 311–320.
- 492. ROMERO-PUERTAS M.C., CORPAS F.J., RODRIGEZ-SERRANO M., GOMEZ M., DEL RIO L.A., SANDALIO L.M. (2007): Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea leaves. *J Plant Physiol* 164, 1346-1357.
- 493. ROMERO-PUERTAS M.C., PALMA J.M., GOMEZ L.A., DEL RIO L.A., SANDALIO L.M. (2001): Cadmium causes oxidative modification of proteins in plants. *Plant Cell Environ* 25, 677-686.

- 494. ROMERO-PUERTAS M.C., RODRIGEZ-SERRANO M., CORPAS F.J., GOMEZ M., DEL RIO L.A., SANDALIO L.M. (2004): Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27, 1122-1134.
- 495. ROS BARCELÓ A., PEDRENO M.A., MUNOZ R., SABATER F. (1989): Physiological significance of the binding of acidic isoperoxidases to cell walls of lupin. *Physiol. Plant* 75, 267–274.
- 496. ROSSIGNOL M, PELTIER JB, MOCK HP, MATROS A, MALDONADO AM, JORRIN JV. (2006): Plant proteome analysis: a 2004–2006 update. *Proteomics* 6:5529–48.
- 497. ROTH U., VON ROEPENACK-LAHAYE E., CLEMENS S. (2006): Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. *J Exp Bot* 57 (15): 4003-4013.
- 498. ROZEN S., SKALETSKY H.J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Szerk.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- 499. RUIZ-HERRERA J. (1992): Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 500. RYALS J.A., WEYMANN K., LAWTON K., FRIEDRICH L., ELLIS D., STEINER H.Y., JOHNSON J., DELANEY T.P., JESSE T., VOX P. et al. (1997): The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IkB. *Plant Cell* 9, 425-439.
- 501. SAGI M., FLUHR R. (2001): Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol* 126, 1281-1290.
- 502. SAGI M., FLUHR R. (2006): Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology* 141, 336-340.
- 503. SAHA B.C. (2000): α--Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18(5): 403-423.
- 504. SAKURAI N. (1998): Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. J Plant Res 111, 133-148
- 505. SAMAC D.A., SHAH D.M. (1991): Developmental and pathogen-induced activation of the Arabidopsis acidic chitinase promoter. *Plant Cell* 3, 1063-1072.
- 506. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed.; *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.*
- 507. SAMMONS D.W., ADAMS L.D., NISHIZAWA E.E. (1981): Ultrasensitive Silver-based Color Staining of Polypeptides in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 81(2): 135-141.
- 508. SAN CLEMENTE H., PONT-LEZICA R. AND JAMET E. (2009): Bioinformatics as a tool for assessing the quality of sub-cellular proteomic strategies and inferring functions of proteins: plant cell wall proteomics as a test case. *Bioinform. Biol. Insights*, (in press).
- 509. SANCHO A.I., GILLABERT M., TAPP H., SHEWRY P.R., SKEGGS P.K., CLARE MILLS E.N. (2008): Effect of Environmental Stress during Grain Filling on the Soluble Proteome of Wheat (Triticum aestivum) Dough Liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56** (13): 5386-5393.
- 510. SANITÁ DI TOPPI L., GABBRIELLI R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41, 105-130.
- 511. SAPPL P.G., ONATE-SANCHEZ L., SINGH K.B., MILLAR A.H. (2004): Proteomic analysis of glutathione S-transferases of Arabidopsis thaliana reveals differential salicylic acid-induced expression of the plantspecific *phi* and *tau* classes. *Plant Molecular Biology* 54, 205–219.
- 512. SAROWAR S., KIM Y.J., KIM E.N., KIM K.D., HWANG B.K., ISLAM R., SHIN J.S. (2005): Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep* 24, 216–224.
- 513. SARRY J.E., KUHN L DUCRUIX C., LAFAYE A., JUNOT C., HUGOVIEUX V. et al. (2006): The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure expolored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6, 2180-2198.
- 514. SATTELMACHER B. (2001): The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol* 149, 167-192.

- 515. SATTELMACHER B., HORST W.J. (Szerk.) (2007): The apoplast of higher plants: Compartment of storage, transport and reactions. The significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants. *Springer Netherlands* (472 oldal)
- 516. SAUTER A, DAVIES WJ, HARTUNG W. (2001): The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot.* 52(363):1991-1997.
- 517. SAUTER A., DIETZ K.-J., HARTUNG W. (2002): A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell and Environment* 25, 223–228
- 518. SCHACHERMAYR G., SIEDLER H., GALE M.D., WINZELER H., WINZELER M., KELLER B. (1994): Identification and localization of molecular markers linked to the Lr 9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet* 88:110–115
- 519. SCHEEL T., PRITSCHK., SCHLOTER M., KALBITZ K. (2008): Precipitation of enzymes and organic matter by aluminum Impacts on carbon mineralization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171(6): 900-907.
- 520. SCHENA M., SHALON D., DAVIS R., BROWN P. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270:467-470.
- 521. SCHLUMBAUM A., MAUCH F., VOGELI U., BOLLER T. (1986): Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Lett. Nature* 324:365-367.
- 522. SCHOPFER C.R., NASRALLAH M.E., NASRALLAH J.B. (1999): The Male Determinant of Self-Incompatibility in *Brassica. Science* 286(5445): 1697-1700.
- 523. SCHRAUDNER M., ERNST D., LANGEBARTELS C., SANDERMAN H.J.R. (1992) Biochemical plant responses to ozone III. Activation of defense related proteins β-1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 9, 1321–1328.
- 524. SCHUMACHER J., RANDIES J.W., RIESNER D. (1983): A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* 135, 288–295.
- 525. SCHÜTZENDÜBEL A., POLLE A. (2002): Plant response to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53, 1351-1365.
- 526. SCHÜTZENDÜBEL A., SCHWANZ P., TEICHMANN T., GROSS K., LANGENFELD-HEYSER R., GODBOLD D.L., POLLE A. (2001): Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*. 127, 887–898.
- 527. SCHWEIZER P., CHRISTOFFEL A., DUDLER R. (1999): Transient expression of members of the germinlike gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J.* 20:541-552.
- 528. SEARS E.R. (1956): The transfer of leaf-rust resistance from Aegilops umbellulata to wheat. *Brookhaven Symposia in Biology* 9, 1–22.
- 529. SEGARRA C.I., CASALONGUÉ C.A., PINEDO M.L., RONCHI V.P., CONDE R.D. (2003): A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *J Exp Bot* 54(386):1335-1341.
- 530. SEKIMATA M., OGURA K., TSUMURAYA Y., HASHIMOTO Y., YAMAMOTO S. (1989): A Beta-Galactosidase from Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds. *Plant Physiol* 90 (2): 567-574.
- 531. SELYE H. (1936): A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138, 32.
- 532. SEMANE B., DUPAE J., CUYPERS A., NOBEN J.P., TUOMAINEN M., TERVAHAUTA A., KÄRENLAMPI S., VAN BELLEGHEM F., SMEETS K., VANGRONSVELD J. (2010): Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 167(4): 247– 254.
- 533. SENCHOU V, WEIDE R, CARRASCO A, BOUYSSOU H, PONT-LEZICA R, GOVERS F, CANUT H. (2004): High affinity recognition of a *Phytophthora* protein by *Arabidopsis* via an RGD motif. *Cell Mol Life Sci.* 61(4):502-509.
- 534. SEUL K.J., PARK S.H., RYU C.M., LEE Y.H., GHIM S.Y. (2007): Proteome Analysis of Paenibacillus polymyxa E681 Affected by Barley. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(6): 934-944
- 535. SHARMA S.S., DIETZ K.J. (2008): The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* 14, 43–50.

- 536. SHEN L., GONG J., CALDO R.A., NETTLETON D., COOK D., WISE R.P., DICKERSON J.A. (2005): BarleyBase—an expression profiling database for plant genomics. *Nucleic Acids Research* 33 (1):614-618.
- 537. SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. (1996): Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal Chem* 68 (5): 850-858.
- 538. SHOWALTER A.M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58, 1399–1417.
- 539. SIBIKEEV S.N., KRUPNOV V.A., VORONINA S.A., ELESIN V.A. (1996): First report on leaf rust pathotypes virulent to higly effective Lr-genes transferred from *Agropyron* species to bread wheat. *Plant Breeding* 115 (4): 276-278.
- 540. SILVERBERG B.A. (1976): Cadmium-induced ultrastructural changes in mitohindria of freshwater gree algae. *Phycologia* 15, 155-159.
- 541. SIMMONS C.R., LITTS J.C., HUANG N., RODRIGUEZ R.L. (1992): Structure of a rice β-glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic acid and fungal elicitors. *Plant Mol Biol* 18, 33–45.
- 542. SIMMONS, C.R. (1994): The physiology and molecular biology of plant 1,3-β-D-glucanases and 1,3;1,4-β-D-glucanases. *Crit Rev Plant Sci* 13, 325–387.
- 543. SIMONETTI E., VERONICO P., MELILLO M.T., DELIBES Á., ANDRÉS M.F., LÓPEZ-BRANA I. (2009): Analysis of Class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*. MPMI 22 (9): 1081-1092.
- 544. SINGH N.K., NELSON D.E., KUHN D., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1989): Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaption to low water potential. *Plant Physiol* 90, 1096–1101.
- 545. SINGH S., EAPEN S., D'SOUZA S.F. (2006): Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233–246
- 546. SLAKESKI N., FINCHER G.B. (1992.): Barley (1-3,1-4)-β-glucanase isoenzyme EI gene expression is mediated by auxin and gibberellic acid. *FEBS Lett* 306, 98–102.
- 547. SLAWECKI R.A., RYAN E.P., YOUNG D.H. (2002) Novel Fungitoxicity Assays for Inhibition of Germination-Associated Adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* Spores. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 597–601.
- 548. SLOVIK S, DAETER W, HARTUNG W. (1995): Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid (ABA) in roots as influenced by environmental changes: a biomathematical model. J Exp Bot 46, 881– 894.
- 549. SMITH A.P., DERIDEER B.P., GUO W-J., SEELEY E.H., REGNIER F.E., GLODSBROUGH P.B. (2004): Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferase from benaxor- and copper-treated seedlings. J Biol Chem 279: 26098-26104.
- 550. SOARES N.C., FRANCISCO R., RICARDO C.P., JACKSON P.A. (2007): Proteomics of ionically bound and soluble extracellular proteins in *Medicago truncatula* leaves. *Proteomics* 7: 2070–2082.
- 551. SOCK J., ROHRINGER R., KANG Z. (1990): Extracellular beta-1,3-glucanases in stem rust-affected and abiotically stressed wheat leaves. Immunocytochemical localization of the enzyme and detection of multiple forms in gels by activity staining with dye-labeled laminarin. *Plant Physiol* 94 (3): 1376-1389.
- 552. SOMERVILLE C., BAUER S., BRININSTOOL G., FACETTE M., HAMANN T., MILNE J., OSBORNE E., PAREDEZ A., PERSSON S., RAAB T., VORWERK S., YOUNGS H. (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211.
- 553. SOMSSICH I.E., SCHMELZER E., BOLLMANN J., HAHLBROCK K. (1986): Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2427-2430.
- 554. SORRELLS M.E., LA ROTA C.M., *ET AL.* (2003): Comparative DNA Sequence Analysis of Wheat and Rice Genomes. *Genome Research* 13:1818-1827.
- 555. SOUTHERTON S.G., DEVERALL B.J. (1990):Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici. Physiological and Molecular Plant Pathology* 37(6): 437-450.
- 556. SRINIVASAN M.C., RELE M.V. (1999): Microbial xylanases for paper industry. Curr Sci 77(1): 137–142.

- 557. STARRACH N., MAYER W.E. (1989): Changes of the apoplasmic pH and K1 concentration in the *Phaseolus pulvinus* in situ in relation to rhythmic leaf movements. *J Exp Bot* 40, 865–873.
- 558. STEUDLE E., SMITH J.A.C., LÜTTGE U. (1980): Water-relation parameters of individual mesophyll cells of *Kalanchöe daigremontiana*. *Plant Physiol* 66, 1155–1163.
- 559. STEWART R.J., VARGHESE J.N., GARRETT T.P., HØJ P.B., FINCHER G.B. (2001): Mutant barley  $(1\rightarrow3,1\rightarrow4)$ -beta-glucan endohydrolases with enhanced thermostability. *Protein Eng.* 14, 245–253.
- 560. STINTZI A., HEITZ T., PRASAD V. et al. (1993): Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687-706.
- 561. STROIŇSKI A. (1999): Some physiological and biochemical aspects of palnt resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiologiai Plantarum* 21 (2): 175-188.
- 562. SUTY L., LEQUEU J., LANÇON A., ETIENNE P., PETITOT A.-S., BLEIN J.-P. (2003): Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 637–650.
- 563. SÜLE A. (2008): Környezeti tényezők hatásának vizsgálata az árpában proteomikai módszerekkel. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola.
- 564. SÜLE A., VANROBAEYS F., HAJÓS GY., VAN BEEUMEN J., DEVREESE B. (2004): Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry* 65(12):1853-63.
- 565. SVENSSON B., SVENDSEN I., HOJRUP P., ROEPSTORFF P., LUDVIGSEN S., POULSEN F.M. (1992): Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry* 31 (37), 8767-8770.
- 566. SWART S., LOGMAN T.J.J., SMIT G., LUGTENBERG B.J.J., KIJNE J.W. (1994): Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment of Rhizobiaceae, *Plant Mol. Biol.* 24, 171–183.
- 567. SZIGETI Z. (1998): Növények és a stressz. In: Láng Z (Szerk.): Növényélettan. A növényi anyagcsere. (Egyetemi tankönyv). 14. fejezet, 916. p. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 1998.
- 568. SZIKRISZT B. (2009): Levélrozsda-fertőzés hatásának transzkripciós szintű vizsgálata rezisztens és fogékony búzavonalakban. (Diplomamunka) *Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar*
- TAKEDA H.J., KOTAKE T., NAKAGAWA N., SAKURAI N., NEVINS D.J. (2003): Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in asparagus somatic embriogenesis. *Plant Physiol* 131, 1765-1774.
- 570. TAMÁS L., BOČOVÁ B., HUTTOVÁ J., MISTRÍK I., OLLÉ M. (2006): Cadmium-induced inhibition of apoplastic ascorbate oxidase in barley roots. *Plant Growth Regulation* 48, 41-49.
- 571. TAMÁS L., ĎURČEKOVÁ K., HALUŠKOVÁ L., HUTTOVÁ J., MISTRÍK I., OLLÉ M. (2007): Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere* 66, 1292–1300.
- 572. TAN K.C., IPCHO S.V.S, TRENGOVE D., OLIVER R.P., SOLOMON P.S. (2009): Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular Plant Pathology* 10(5):703-715
- 573. TERRAS F.R.G., SCHOOFS H., DE BOLLE M.F.C., VAN LEUVEN F., REES S.B., VANDERLEYDEN J., CAMMUE B.P.A., BROEKAERT W.F. (1992): Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* 267, 15301-15309.
- 574. TETLOW I.J., FARRAR F. (1993): Apoplasmic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *J Exp Bot* 44, 929–936.
- 575. THALMAIR M., BAUW G., THIEL S., DOEHRING T., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. Jr. (1996): Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins β-1,3-glucanase and chitinase in tobacco. J Plant Physiol 148(1-2):222-228.
- 576. THOMAS B.R., INOUHE M., SIMMONS C.R., NEVINS D.J. (2000): Endo-1,3;1-4- $\beta$ -glucanase from coleoptiles of rice and maize: role in the regulation of plant growth. *Int J Biol Macromol* 27, 145–149.

- 577. THORDAHL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D.B. (1997): Subcellular localization of H2O2 in plants: accumulation in papillae and hypersensitive response during powdery-mildew interaction. *The Plant Journal* 11, 1187-1194.
- 578. TIAN M., HUITEMA E., DA CUNHA L., TORTO-ALALIBO T., KAMOUN S. (2004): A Kazal-like Extracellular Serine Protease Inhibitor from Phytophthora infestans Targets the Tomato Pathogenesis-related Protease P69B. *J Biol Chem* 279, 26370-26377.
- 579. TIMPERIO A.M., EGIDI M.G., ZOLLA L. (2008): Proteomics applied on plant abiotic stresseses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71, 391-411.
- 580. TISCHLER C.R., VOIGT, P.W. (1984): Screening and selection to improve establishment of warm-season forage grasses in arid regions. *In: Proc. Am. Forage and Grassl. Conf.Houston, TX, 23–26 January 1984, Am. Forage and Grassl. Council, Georgetown, TX,* pp. 115–119.
- 581. TON J., MAUCH-MANI B. (2004): β-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal* 38, 119–130.
- 582. TON J., VAN PELT J.A., VAN LOON L.C., PIETERSE C.M.J. (2002): Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*, 15, 27-34.
- 583. TORRES M.A., DANGL J.L., JONES J.D.G. (2002): Arabidopsis gp91(phox) homologues AtrohD and AtrohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 517–522.
- 584. TREZZINI G.F., HORRICHS A., SOMISICH I.E. (1993): Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol Biol* 21, 385-389.
- 585. TRIPATHY S., VENABLES B. J., CHAPMAN K.D. (1999): N-Acylethanolamines in signal transduction of elicitor perception. Attenuation of alkalinization response and activation of defense gene expression. *Plant Physiol* 121, 1299–1308.
- 586. TRUDEL J., GRENIER J., POTVIN C., ASSELIN A. (1998) Several thaumatin-like proteins bind to β-1,3glucans. *Plant Physiol* 118, 1431-1438.
- 587. TSUDA K., SATO M., GLAZEBROOK J., COHEN J.D., KATAGIRI F. (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* 53, 763-775.
- 588. VAKHMISTROV D.B. (1967): Localization of the free space in the barley roots. Fiziol Rast 14, 397–404.
- 589. VALLELIAN B.L., MOSINGER E., METRAUX J.P., SCHWEIZER P. (1998) Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Mol Biol* 37: 297–308.
- 590. VALLELIAN B.L., MOSINGER E., METRAUX J.P., SCHWEIZER P. (1998): Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Mol. Biol.* 37:297-308.
- 591. VAN ASSCHE F.J. (1998) "A Stepwise Model to Quantify the Relative Contribution of Different Environmental Sources to Human Cadmium Exposure," Paper to be presented at NiCad '98, Prague, Czech Republic, September 21-22, 1998.
- 592. VAN DER WEL H., LOEVE K. (1972): Isolation and characterization of Thaumatin I and II, the sweet tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 31, 221–225.
- 593. VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z. (1996): Protein composition of wheat apoplastic fluid and resistance to Russian wheat aphid. *Aust J Plant Physiol* 23, 645-648.
- 594. VAN LOON L.C. (1982): Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: Active Defense Mechanisms in Plants (R.K.S. Wood, ed.), pp. 247-273, Plenum Press, New York, USA.
- 595. VAN LOON L.C. (1999): Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta SK & Muthukrishnan S (Szerk.): Pathogenesis-related Proteins in Plants (pp. 1–19). CRC
- 596. VAN LOON L.C., REP M., PIETERSE C.M.J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162.
- 597. VAN LOON L.C., VAN STRIEN E.A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55, 85-97.

- 598. Vensel W.H., Tanaka C.K., Cai N., Wong J.H., Buchanan B.B., Hurkman W.J. (2005): Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5: 1594–1611.
- 599. VERA P., CONEJERO V. (1988): Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol* 87, 58-63.
- 600. VERMA K., SHEKHAWAT G.S., SHARMA A., MEHTA S.K., SHARMA V. (2008): Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedlinds and 3-4 leaf stage plants of Brassica juncea (L.) czern. *Plant Cell Rep* 27, 1261-1269.
- 601. VERMERRIS W., NICHOLSON R. (2007): The Role of Phenols in Plant Defense. In: *Phenolic Compound Biochemistry*, pp. 211-234. Springer Netherlands, 2006.
- 602. VERRET F., GRAVOT A., AUROY P., LEONHARDT N., DAVID P., NUSSAUME L. et al. (2004): Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant meal tolerance. *FEBS Lett* 576, 306-312.
- 603. VIDA G.Y., MANNINGER S.N.É. et al. (1999): A búza levélrozsda rezisztencia kutatások eredményeiből. Jubil. Tudom. Ülés 1999. június 2-3. Mv Elitmag Kft. http://www.elitmag.hu/informaciok.php
- 604. VÍTÁMVÁS P.L., KOSOVÁ K., PRÁŠIL I.T. (2007): Proteome Analysis in Plant Stress Research *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 43, 2007 (1): 1–6.
- 605. VITÓRIA A.P., DA CUNHA M., AZEVEDO R.A. (2006):Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58 (2006) 47–52
- 606. VÖGELI-LANGE R, FRÜNDT C, HART CM, BEFFA R, NAGY F, MEINS F JR. (1994): Evidence for a role of β-1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J* 5(2):273-278.
- 607. VU J.C.V., GESCH R.W., ALLEN L.H., BOOTE K.J., BOWES G. (1999): CO2 enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. *Journal of Plant Physiology* 155, 139–142.
- 608. WALLIWALAGEDARA C, ATKINSON I, VAN KEULEN H, CUTRIGHT T, WEI R. (2010): Differential expression of proteins induced by lead in the Dwarf Sunflower *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 71, 1460–1465.
- 609. WALLPROTDB (2009) adatbázis honlapja http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/WallProtDB/index.php legutolsó frissítés: 2009. febr. 28.
- 610. WANG D., PAJEROWSKA-MUKHTAR K., HENDRICKSON CULLER A., DONG X. (2007): Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17, 1784–1790.
- 611. WANG K.L-C., LI H., ECKER J.R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* S131-S151.
- 612. WANG Y., ZAIANE O.R., GOEBEL R., SOUTHRON J.L., BASU U., WHITTAL R.M., STEPHENS J.L., TAYLOR G.J. (2004): Developing a Database for Proteomic Analysis of Extracytosolic Plant Proteins, 2nd International Workshop on Biological Data Management (BIDM'2004) in conjunction with the 15th Int' Conf. on Database and Expert Systems Applications DEXA2004, pp. 366-370, Zaragoza, Spain, August 30-September 3, 2004
- 613. WATERHOUSE A.M., PROCTER J.B., MARTIN D.M.A, CLAMP M., BARTON G.J. (2009): Jalview version 2 a multiple sequence alignment editor and aanlísis workbench. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- 614. WATSON B.S., ASIRVATHAM V.S., WANG L., SUMNER L.W. (2003): Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago trunculata*). *Plant Physiol* 131: 1104–1123
- 615. WATSON B.S., SUMNER L.W. (2007): Isolation of cell wall proteins from Medicago truncatula stems. In: Thiellement H, Ziivy M, Damerval C, Méchin V (Szerk.): *Plant Proteomics. Methods and protocols.* Methods in Molecular Biology 355. kötet (399 oldal). Humana Press, 2007.
- 616. WEI Y., ZHANG Z., ANDERSEN C.H., SCHMELZER E., GREGERSEN P.L., COLLINGE D.B., SMEDEGAARD-PETERSEN V., THORDAL-CHRISTENSEN, H. (1998): An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* 36, 101-112.

- 617. WEN F., CELOY R., PRICE I., EBOLO J.J., HAWES M.C. (2008): Identification and characterization of a rhizosphere β-galactosidase from *Pisum sativum* L. *Plant and Soil* 304 (1-2):133-144.
- 618. WEN F., VANETTEN H.D., TSAPRAILIS G., HAWES M.C. (2007): Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. Plant Physiol. 143(2):773-83.
- 619. WESSELS J.G.H., SIETSMA J.H. (1981): Fungal cell wall: a survey. Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates. Encyclopedia of Plant Physiology (Tanner, W. & Loewus, F.A., eds), pp. 352-394. Vol. 13B. Springer-Verlag, Berlin.
- 620. WHITE R.F., RYBICKI E.P., VON WECHMAR M.B., DEKKER J.L., ANTONIW J.F. (1987): Detection of PR 1-type protein sin Amaranthaceae, Chanopodiaceae, Gramineae and Solanaceae by immunoblotting. J Gen Virol 68, 243-2048.
- 621. WILKINS M.R., PASQUALI C., APPEL R.D., OU K., GOLAZ O., SANCHEZ J.-CH., JUN X. YAN, GOOLEY A.A., HUGHES G., HUMPHERY-SMITH I., WILLIAMS K.L., HOCHSTRASSER D.F. (1996): "From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis". *Nature Biotechnology* 14 (1): 61–65.
- 622. WILKINSON S. & DAVIES W.J. (1997): Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol* 113, 559–573.
- 623. WILKINSON S. (1999): pH as a stress signal. *Plant Growth Regulation* 29, 87–99.
- 624. WINZELER M., MESTERHÁZY A., PARK R.F., BARTOS P., CSŐSZ M. ET AL. (2000): Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20(7): 783-792.
- 625. WIRTH S.J., WOLF G.A. (1990): Dye labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J. Microbiol. Meth.* 12, 197–205.
- 626. WITZEL K., WEIDNER A., SURABHI G.K., BÖRNER A., MOCK H.P. (2009): Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *J Exp Bot* 60(12):3545-57.
- 627. WOLF N. (1992): Structure of the genes encoding *Hordeum vulgare* (1-3,1-4)- $\beta$ -glucanase isoenzymes I and II and functional analysis of their promoters in barley aleurone protoplasts. *Mol Gen Genet* 234, 33–42..
- 628. WOLF O., MUNNS R., TONNET M.L., JESCHKE W.D. (1990): Concentrations and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of NaCl-treated *Hordeum vulgare*. J Exp Bot 41, 1133–1141.
- 629. WORLD BANK GROUP (1998): Cadmium. In: Pollution and Abatement Handbook, (pp. 212-214.) 1998 www.ifc.org/ifcext/enviro.nsf/AttachmentsByTitle/p\_ppah\_pgiuCadmium/\$FILE/HandbookCadmium.pdf
- 630. WORRALL D., HIRD D.L., HODGE R., PAUL W., DRAPER J. SCOTT R. (1992): Premature Dissolution of the Microsporocyte Callose Wall Causes Male Sterility in Transgenic Tobacco. *The Plant Cell* 4, 759-771.
- 631. WU S., KRIZ A.L., WIDHOLM J.M. (1994): Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class I chitinase in maize. *Plant Physiol* 105(4):1097–1105.
- 632. XING L-P., WANG H-Z., JIANG Z-N., NI J-L., CAO A-Z., YU L., CHEN P-D. (2008): Transformation of Wheat Thaumatin-Like Protein Gene and Analysis of Reactions to Powdery Mildew and *Fusarium* Head Blight in Transgenic Plants. *Acta Agronomica Sinica* 34 (3): 349-354.
- 633. XU Y., CHANG P.F.L., LIU D., NARASIMHAN M.L., RAGHOTHAMA K. G., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1994): Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077–1085.
- 634. YAISH M.W.F., DOXEY A.C., MCCONKEY B.J., MOFFATT B.A., GRIFFITH M. (2006): Cold active winter rye glucanases with ice-binding capacity. *Plant Physiol* 141, 1459–1472.
- 635. YAMAGUCHI, T., NAKAYAMA, K., HAYASHI, T., TANAKA, Y., KOIKE, S. (2002): Molecular Cloning and Characterization of a Novel β-1,3-glucanase Gene from Rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1403– 1406.
- 636. YAN L., FU D., LI C., BLECHL A., TRANQUILLI G., BONAFEDE M., SANCHEZ A., VALARIK M., YASUDA S., DUBCOVSKY J. (2006): The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (51), 19581-19586.

- 637. YANNARELLI G.G., FERNÁNDEZ-ALVAREZ A.J., SANTA-CRUZ D.M., TOMARO M.L. (2007): Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 505-512.
- 638. YAO W.L., WANG Y.S., HAN J.G., LI L.B., SONG W. (2004): Purification and cloning of an antifungal protein from the rice diseases controlling bacterial strain *Paenibacillus polymyxa* WY110. *Yi Chuan Xue Bao* 31(9):878-87.
- 639. YEH S., MOFFATT B.A., GRIFFITH M., XIONG F., YANG D.S.C., WISEMAN S.B., SARHAN F., DANYLUK J., XUE Y.Q., HEW C.L., DOHERTY-KIRBY A., LAJOIE G. (2000): Chitinase Genes Responsive to Cold Encode Antifreeze Proteins in Winter Cereals. *Plant Physiol* 124(3): 1251–1264.
- 640. YU J., HU S., WANG J. ET AL. (2002): A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296(5565): 79 92.
- 641. YUAN L., XU D.Q. (2001): Stimulation effect of gibberellic acid short-term treatment on leaf photosynthesis related to the increase in RuBisCO content in broad bean and soybean. *Photosynthetic Research* 68, 39-47.
- 642. ZHANG F., ZHANG H., WANG G., XU L., SHEN Z. (2009): Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials* 168, 76–84.
- 643. ZHANG F.S., RÖMHELD V., MARSCHNER H. (1991): Role of the root apoplasm for iron acquisition by wheat plants. *Plant Physiol* 97, 1302–1305.
- 644. ZHANG H., XIA Y., WANG G., SHEN Z. (2008) Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper–zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* 227(2):465-475
- 645. ZHANG H., ZHANG F., XIA Y., WANG G., SHEN Z. (2010): Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase. *Journal of Hazardous Materials* (in press), doi:10.1016/j.jhazmat.2010.02.014
- 646. ZHANG L., TIAN L-H., ZHAO J-F., SONG Y., ZHANG C-J., GUO Y.I. (2009): Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology* 149, 916-928.
- 647. ZHANG Q., XU F., LAMBERT K.N., RIECHERS D.E. (2007): Safeners coordinately induce the expression of multiple proteins and MRP transcripts involved in herbicide metabolism and detoxification in *Triticum tauschii* seedling tissues. *Proteomics* 7:1261–1278.
- 648. ZHANG Z., COLLINGE D.B., THORDAL-CHRISTENSEN H. (1995): Germin-like oxalate oxidase, a H2O2producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* 8, 139-145.
- 649. ZHENG Y., WOZNIAK C.A. (1997): Adaptation of a β-1,3-Glucanase Assay to Microplate Format. *BioTechniques* 5 (22): 922-926.
- 650. ZHOU W., EUDES F., LAROCHE A. (2006): Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* 6, 4599–4609.
- 651. ZHU B., CHEN T.H.H., LI P.H. (1996): Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198, 70–77.
- 652. ZHU J., ALVAREZ S., MARSH E.L., LENOBLE M.E., CHO I.J., SIVAGURU M., CHEN S., NGUYEN H. T., WU Y., SCHACHTMAN D.P., SHARP R.E. (2007): Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit. *Plant Physiology* 145(4):1533-48.
- 653. ZIEGENHAGEN B., GUILLEMAUT P., SCHOLZ F. (1993): A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Mol Biol Rep* 11:117–121.
- 654. ZIMMERLI L., JAKAB G., MÉTREAUX J.P., MAUCH-MANI B. (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12920-12925.
- 655. ZIMMERMANN G., BAUMLEIN H., MOCK H.P., HIMMELBACH A., SCHWEIZER P. (2006): The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant Physiol* 142 (1): 181-192.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Lukács Noéminek, aki más növényi kutatási területről érkező friss diplomás létemre bizalmat szavazott a Tanszéken molekuláris biológiai munkám megkezdéséhez, és aki hasznos tanácsaival és lényeglátásával mindvégig segítette, szakmailag irányította munkámat. Köszönöm továbbá, hogy amellett, hogy törekedett személyiségem a kutatásban kevésbé célravezető megnyilvánulási formáinak nyesegetésére, mindvégig támogatta a gondolkodási szabadság megőrzését és doktoranduszai kutatói önállóságának kifejlődését.

Köszönettel tartozom a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék minden fiatal vagy idősebb, hajdani és jelenlegi munkatársának önzetlen szakmai segítségükért, gondolatcseréinkért és az idők során kialakuló barátságukért, amelynek révén egy nyílt és tiszta légkörű, színvonalas kutatócsoport tagjává válhattam.

Köszönöm a témán szakdolgozó hallgatóim, Kabai Mónika, Rab Enikő és Szikriszt Bernadett lelkesedését, lelkiismeretes és kitartó munkáját valamint Duan Huei-Jun és Rosa Caiazzo vendégkutatónak a közös munka lehetőségét.

Külön köszönet illeti kizárólag kooperációban kivitelezhető munkánk együttműködő partnereit, akik nélkül eredményeink töredéke születhetett volna csak meg:

Köszönöm Manninger Sándornénak az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Kórélettani Osztályán, hogy a búza levélrozsda-fertőzésekhez szükséges helyszínt, növényállományt és a fertőzésekhez elengedhetetlen szakmai tudását kitartóan biztosította hosszan elhúzódó biotikus rezisztencia-vizsgálataink során. Az Lr1 magvak nélkülözhetetlen utánpótlásáért az USDA ARS Cereal Disease Laboratory munkatársának, James A. Kolmernek tartozom hálával. A tanszéki árpa nehézfémstressz-kutatásokba való bekapcsolódás lehetőségét egykori kollégámnak, Jócsák Ildikónak köszönöm, aki jelenleg a martonvásári MgKI Növénytermesztési Osztályának munkatársa. A referencia-apoplaszt-térképezéshez szükséges búzafajta, a cv. 'Chinese Spring' maganyagának biztosításáért Kovács Gézát, a MgKI Gabona Génbankja munkatársát illeti köszönet. Hálámat szeretném kifejezni az MTA SzBK Proteomikai Kutatócsoportja valamennyi munkatársának, külön kiemelve Hunyadi-Gulyás Évát és Szájli Emíliát, akik mindvégig töretlen precizitással és megbízhatósággal végezték apoplaszt fehérjemintáim proteomikai azonosítását, és akikhez kérdéseimmel a tömegspektrometria mélységei kapcsán is bármikor fordulhattam.

Köszönet illeti Cserháti Mátyást és Györgyey Jánost, az MTA SZBK Növényélettani intézetnek munkatársait, akik szaktudásukkal és bioinformatikai hátterükkel a rizs homológok promóter-analízise révén kapcsolódtak be a gombafertőzéssel asszociált stresszkutatásainkba.

Köszönöm barátaimnak, hogy a némelykor több hónapot is késő visszahívásaim után is úgy vették fel a kapcsolat fonalát, mintha csak a minap futottunk volna össze.

Végül köszönöm páromnak, hogy meglátta bennem azt, amit egyelőre magam is csak remélni merek és elbizonytalanodásaim során is mindvégig kitartott mellettem.

Munkámat elsősorban családomnak, szüleimnek és bátyámnak ajánlom, akik szeretetükkel türelmesen viselték személyiségem a doktoranduszi lét árnyasabb oldala kapcsán is testet öltő gyengeségeit, töretlen lelkesedéssel hitték, hogy minden életszakasz értéket hordoz és nem utolsósorban bíztak benne, hogy ez is lezárul egyszer – nekik mindenkor hálával tartozom.