

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A BAKTÉRIUMOK ÁLTAL KIVÁLTOTT NÖVÉNYI ÁLTALÁNOS VÉDEKEZÉS (BR)
HATÁSA VÍRUSFERTŐZÉSRE,
VALAMINT BR SORÁN MEGVÁLTOZOTT AKTIVITÁSÚ GÉNEK VIZSGÁLATA**

ZSIROS LÁSZLÓ

TÉMAVEZETŐK:

PALKOVICS LÁSZLÓ, DSC

BOZSÓ ZOLTÁN, PHD



BUDAPESTI
CORVINUS
EGYETEM

Kertészettudományi Kar

BUDAPEST

2012

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna

egyetemi tanár, DSc

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezetők: Dr. Palkovics László,

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Növénykórtani Tanszék

Dr. Bozsó Zoltán,

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,
Növényvédelmi Intézet

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.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1. Bevezetés

A növények sejtközötti járataiban a baktériumok ideális szaporodási feltételeket találhatnának. Az asszimilátákban gazdag szövetnedvek és a külső környezeti ártalmaktól való védettség egyaránt kedvezhetne a mikroorganizmusok elszaporodásának. Hogy mindez mégsem így van, az annak köszönhető, hogy a növények az evolúció során különböző védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki a mikroorganizmusok ellen.

2. Irodalmi áttekintés

Király és mtsai. (2007) a növényi rezisztenciaformákat áttekintő szemlecikkükben a védekezési mechanizmusokat két fő osztályra bontják: öröklött (*innate*, "veleszületett") és szerzett (*acquired*) védekezésre.

Az öröklött védekezési mechanizmusokat specificitás szempontjából további két csoportba osztják: nem specifikus, ún. általános védekezésre (*non-specific, general resistance*) és specifikus védekezési módokra (mint például a HR – *hypersensitive response*; hiperszenzitív reakció). Ebben a felosztásban a nem-specifikus csoportban kap helyet az általános védekezés (BR - *basal resistance*).

A nevezéktan nem egységes. Boller és Felix (2009) például a PTI-vel (*PAMP-triggered Immunity*)² feleltetik meg a BR-t, egyben utalva arra, hogy az irodalomból kizorulóban van a *basal resistance* elnevezés.

A BR-re jellemző, hogy számos mikroorganizmus, patogének és szaprofiták egyaránt képesek indukálni (Burgyn és Klement, 1979). A hiperszenzitív reakciót viszont kizárólag élő, aktív anyagcserét folytató kórokozók képesek előidézni. Az általános rezisztencia a HR-rel ellentétben tünetmentes, ezért a jelenlétét csak közvetve lehet érzékelni, például azáltal, hogy egy második, ún. „*challenge*” fertőzés során a HR nekrozis elmarad (Klement és mtsai., 1999).

2.1. A hiperszenzitív reakció (HR)

Eddig már szinte valamennyi vírus, pro- és eukarióta növénykórokozó esetében megfigyelték, hogy képesek a növényben hiperszenzitív reakció kialakítására. HR akkor játszódik le, amikor inkompatibilis a kapcsolat a gazda és a kórokozó között, tehát amikor egy kórokozó a nem-gazdanövényét (pl. bab-kórokozó dohányt) vagy a gazdanövénye egy rezisztens fajtáját támadja meg. Ilyenkor a fertőzött növényi szövet elhal. A növény ellenállóságát és a kórokozó patogenitását és fajtaspecificitását is gének határozzák meg, ezért a HR-t a kórokozó és a növény

2 Bár a PTI elnevezés némi közvetkezetlenséget takar, tekintve, - ahogy erre az idézett cikk is kitér - hogy nem csak a kórokozókra jellemző PAMP-ok (Pathogen-Associated Molecular Patterns), hanem olyan ún. általános elicitorok is, mint a növényi sejtek sérüléseiből köthető mintázatok (DAMP – *damage-associated molecular patterns*).

génjeinek (pontosabban azok géntermékeinek) kölcsönös kapcsolatrendszer határozza meg (Klement, 1982).

A sejt halálához vezető folyamatok a HR során szabályozottan mennek végbe. Az ilyen előre meghatározott módon végbemenő sejtpusztulást programozott sejthalálnak (PCD – *programmed cell death*) nevezzük. Szemben a passzívan elszenvedett sérülésből eredő nekrozissal, a PCD kialakulásához a sejt aktív közreműködésére (pl. fehérjeszintézis) van szükség. (Gilchrist, 1998).

2.2. Általános rezisztencia (BR – basal resistance)

Amíg a hiperszenzitív reakció egy kizárólag kórokozókval szembeni rezisztencia mechanizmus, addig az általános védekezési válaszok nem-patogénekkel szemben is kialakulnak a növényben. Ez a képesség a növények „veleszületett” (*innate*) tulajdonsága, ami segít nekik a sejtközötti térbe bejutó mikroorganizmusok leküzdésében. Ez az adott baktérium egyes életfolyamatainak (pl. szaporodás, kórokozásban részt vevő gének átírása stb.) blokkolásán keresztül történhet. A BR nem csak a kórokozó szaporodását képes gátolni, hanem – inkompatibilis kapcsolatokban – a HR kialakulását is. (Bozsó és mtsai., 1999; Klement és mtsai., 1999; Klement és mtsai. 2003)

Éppen a jól megfigyelhető HR gátlás az, amivel a BR megléte igazolható. Ha egy HR kiváltására alkalmas baktériummal fertőzzük felül a növényt, a nekrotikus léziók elmaradása jelzi a BR működését. (Klement és mtsai., 1999, Klement és mtsai., 2003).

2.2.1. A BR kiváltása

Mivel az általános rezisztenciát kórokozó és nem kórokozó baktériumok egyaránt képesek előidézni, a BR-t olyan bakteriális eredetű molekuláris mintázatok váltják ki, amely általánosan előfordulnak a prokariótákban. Ilyen molekulának bizonyult például a Gram-negatív baktériumok felületét borító lipopoliszacharid (LPS). A tisztított LPS (Newman és mtsai., 1995), illetve LPS-fehérje-komplex (Mazzuchi és Pupillo, 1976) képes BR-t előidézni. De erre más baktérium eredetű molekulák is alkalmasak, mint pl. az ostorokat felépítő fehérje, a flagellin (Felix és mtsai., 1999).

Ezeken az ún. *elicitor* molekulákon kívül a mechanikai és ozmotikus stressz is kiválthatja a BR-t (Novacky és Hanchey, 1976). Ez aligha lehet véletlen, tekintve, hogy a mikrobákhoz köthető molekuláris mintázatok (MAMP – *microbe associated molecular pattern*, pl. flagellin, LPS, EF-Tu) a növényi sejt hasonló módon észleli, mint a DAMP-okat (*damage associated molecular patterns*), vagyis azokat, amelyek a sejtek károsodása során szabadulnak fel (Boller és Felix, 2009).

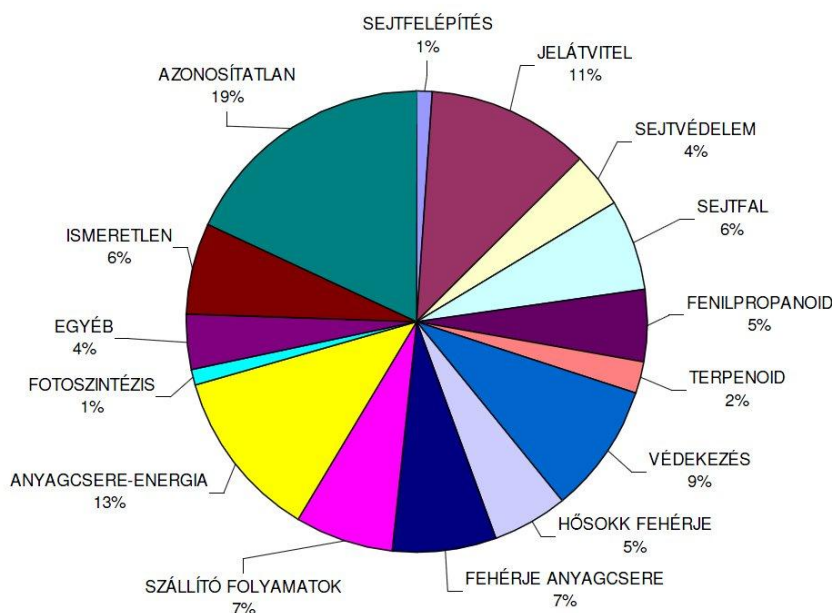
2.2.2. A BR alatt bekövetkező sejtfiziológiai és ultrastrukturális változások

A BR során megfigyelhető a sejten kívüli és ezzel egyidejűleg a sejten belüli pH változása (Baker és mtsai., 1990), a Ca^{2+} (Grant és Mansfield, 1999) be- és a Cl^- ionok kiáramlása (Nürnbergger és mtsai., 1994), valamint az aktív oxigénformák átmeneti felszaporodása (Baker és Orlandi, 1995).

A baktériumok tapadásának helyén a sejtfaalak megerősödését, és a sejtfaal és a sejtmembrán között egy ún. papilla létrejöttét lehet megfigyelni (Politis és Goodman, 1978; Ott és mtsai., 1997). Ezekben a helyeken többek között kallóz beépülése történik, de a lignifikációs folyamatok is megerősödnek (Brown és mtsai., 1998). A biotikus stresszen kívül a kallózlerakódás kísérőjelensége lehet a mechanikus stressznek is (Jaffe és mtsai., 1985). Sőt, a plazmodezmákba történő kallózbeépülés akár a vírusok plazmodezmákon keresztüli (sejtről sejtre történő mozgását) is megakadályozhatja (Radford és mtsai., 1998; Scholthof, 2004; Dong X., 2005).

2.2.3. A BR alatt megváltozott aktivitást mutató, jelátvitelben, illetve fehérjebontásban szerepet játszó gének

Az ebben a dolgozatban ismertetett munkák közvetlen előzményeként kutatócsoportunkban több mint 160 olyan dohány gént sikerült elkülöníteni szubtrakciós módszerrel, amelyek a BR alatt megváltozott aktivitást mutatnak (1. ábra). Ezek több mint tizede a jelátviteli folyamatokhoz, 7%-a pedig a fehérjeanyagcseréhez köthető (Szatmári és mtsai., 2006).



1. ábra. A BR során megváltozott aktivitást mutató gének funkció szerinti aránya (Forrás: Szatmári, 2008)

Az egyik fontos sejten belüli (másodlagos) hírvivő a kalcium-ion. Ennek sejtplazmába áramlása a kalcium-ioncsatornákon kívül történhet például sebzésen vagy a plazmodezmákon

keresztül. A kalciumon kívül szerep juthat a mitogén-aktivált kináz kaszkádoknak (MAPKKK (vagy MEKK) → MAPKK → MAPK → transzkripciós faktor). Ezeket általában egy GTP-kötő fehérje indítja a jelenleg ismert PAMP-ok nagy részének hatására. De a folyamatban fontos szerepe lehet a különböző foszfolipázoknak [foszfolipáz-A1 (PLA1), a foszfolipáz-A2 (PLA2), a foszfolipáz-C (PLC) és a foszfolipáz-D (PLD)] is. (Trewavas, 2000; Pitzschke és mtsai., 2009). A védekezés során létrejövő különböző géntermékek egyensúlyban tartása szintén fontos szabályozó elem (Trewavas, 2000).

A fehérjék lebontása az *ubikvitin úton*, *proteozóma komplexekben* vagy pedig *proteázok* segítségével is történhet (lásd pl. Kim és Delaney, 2002; Vierstra, 2003; van der Hoorn és Jones, 2004). A Szatmári és mtsai. (2006) által azonosított gének között mindkét rendszer elemei megtalálhatóak. A proteázok szerepe nem merül ki a „főlösslegessé vált” fehérjék lebontásában. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy részt vehetnek a baktériumok felismerési folyamatában, a sejten belüli jelátviteli- (Xia és mtsai., 2004), illetve a baktériumok ellen adott védekezési válaszfolyamatok szabályozásában (Abramovitch és mtsai., 2006; Hao és mtsai., 2006).

A védekezési folyamatokban elsősorban a cisztein-proteázoknak van fontos szerepük. A mintegy 140 növényi cisztein-proteáz közül soknak azonosították már a patogének támadására adott válaszként kialakuló programozott sejthalálban (PCD – *programmed cell death*) betöltött funkcióját. Ebbe a körbe tartoznak a kaszpáz-1-szerű fehérjék, amelyekhez hasonló kaszpáz az állati sejtekben is az apoptózis szabályozó folyamataival hozták összefüggésbe. Szintén a PCD-vel hozhatók összefüggésbe az állati kaszpáz-1 enzimmel sok strukturális hasonlóságot mutató növényi metakaspázok (MCA) és az ún. VPE-k (*vacuolar processing enzymes*), amelyek a vakuólum hártájának irányított bontási folyamatában játszanak szerepet (van der Hoorn, 2008; Zhang és mtsai, 2010).

2.3. Vírussal kiváltott géncsendesítés (VIGS – Virus Induced Gene Silencing)

A funkcionális genomikai vizsgálatokban a VIGS rendszer előnye a transzgenikus növényekkel szemben, hogy lényegében bármilyen gén csendesítésére alkalmas. A rendszernek ez a nagyfokú rugalmassága akkor válik igazán hasznossá, amikor olyan géneket vizsgálatára van szükség, melyek fenotipikus megnyilvánulása csak a megfelelő környezeti állapotok elérése esetén válna nyilvánvalóvá. Emellett a segítségével megspórolhatóak a transzgen növények előállításánál elkerülhetetlen idő- és munkaigényes folyamatok (növénynevelés, magfogás) is (Robertson 2004). A VIGS egy változatának tekinthető a Gosselé és mtsai. (2002) által kifejlesztett kétkomponensű rendszer, amelyben a csendesítéshez felhasznált szekvenciát egy szatellitvírus tartalmazza, amelyet a segédvírus (*helper virus*) együtt juttatnak a növénybe. Az utóbbi segíti a szatellitvírus mozgását a növényen belül. Az ún. SVISS (*satellite virus induced silencing system* –

szatellit vírussal kiváltott csendesítés rendszere) előnye, hogy ily módon szétválnak egymástól a vírusreplikációhoz, illetve a csendesítéshez szükséges komponensek. Ezáltal pedig nagyban javítja a csendesítés hatékonyságát. Másik előnyként jelentkezhet, hogy többnyire a szatellitvírusok replikációjával a segédvírusok saját genomjának replikációja csökken. Ez pedig általában a segédvírus hatására kialakuló tünetek mérséklődésében jelentkezik. Jóllehet, olykor – bizonyos gazdákon – megfigyelhető a tünetek súlyosodása is (Roossinck és mtsai. 1992).

3. A megoldandó feladatok ismertetése

Az itt ismertetett munkák három fő csoportra oszthatók:

1. Vizsgáltuk a baktériumok által kiváltott BR hatást egy későbbi vírusfertőzés lefolyására. Inkompatibilis dohány-dohány mozaik vírus (TMV) kapcsolatban az esetleges HR-gátlást, kompatibilis kapcsolatban pedig a BR vírus tünetekre gyakorolt hatást vizsgáltuk. Mindkét kapcsolat esetén követtük a vírus replikációjának mértékét is. Ezeket a munkákat kiegészítettük bizonyos növényi védekezésben szerepet játszó gének BR alatti aktivitásváltozásának vizsgálatával.
2. A kutatócsoportunk által korábban meghatározott, BR során megváltozott aktivitást mutató fehérje-bontásban, illetve jelátvitelben szerepet játszó gének transzkripció változásait követtük nyomon, kiegészítve funkcionális vizsgálatokkal.
3. Módszereket dolgoztunk ki további funkcionális genomikai vizsgálatok elvégzéséhez. (Géncsendesítésre alkalmas konstrukció készítése, növényi proteínáz aktivitás mérése, szövetfestési eljárás kallózkimutatáshoz.)

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált növények

A különböző kísérletekhez modell növényként *Arabidopsis thaliana*t és dohányt (*Nicotiana tabacum* L.) használtunk a vizsgálatok tárgyától függően. A dohányokat üvegházban neveltük. A kísérletekhez általában a 1,5-2 hónapos növények voltak alkalmasak. A *N. tabacum* L. 'Samsun' nn nem, míg a *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN fajta hordozza a TMV rezisztenciáért felelős N-gént. Az előbbit a kompatibilis, az utóbbit az inkompatibilis TMV-növény kapcsolatok vizsgálatánál használtuk. *Arabidopsis thaliana* növények közül egyaránt használtunk Col-0 ökotípust és ennek olyan mutánsait, amelyekből az általunk vizsgálni kívánt tulajdonságokért felelős gének hiányoznak. A mutánsok magvait a Nottingham Arabidopsis Stock Centre-ből (NASC) rendeltük.

4.2. Felhasznált baktériumok

A BR kiváltásához *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns HR-t nem indukáló baktériumot használtunk. A baktériumokat 50 µg/ml kanamycinnel kiegészített King's B táptalajon (King és mtsai, 1954) tenyésztettük 27 °C-on egy éjszakán át. A táptalajról vett baktériumokat vízben szuszpendáltuk. A baktériumszám 0,19-0,21-es OD értékre (kb. 10⁸/ml) való beállítását denzitométerrel végeztük. A proteinázok hatásának vizsgálatához a dohánynövényeket kompatibilis kapcsolat kialakítására képes *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* baktériumszuszpenziót is használtunk a fent meghatározott koncentrációban. A géncsendesítéshez a vírusvektort kompetens *Escherichia coli* DH5α baktériumok felhasználásával állítottuk elő. Egyes géncsendesítési kísérleteknél a géncsendesítést gátló ún. *HC-Pro silencing suppressor* hordozó *Agrobacterium tumefaciens* használtunk (Wydro és mtsai.; 2006). Lumineszcenciát mutató lux-gént kifejező *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Fan és mtsai., 2008) baktériumokat használtunk *Arabidopsis* mutánsokkal végzett kísérletekben, ahol a cél a baktériumszaporodás mértékének meghatározása volt.

4.3. Felhasznált vírusok

A BR vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatásának vizsgálata során dohány mozaik vírust fertőztük a növényeket. A géncsendesítéshez TMV-U2 törzset, ennek módosított szatellitvirusát, STMV-t használtunk.

4.4. A növények kezelésénél felhasznált kémiai anyagok

A proteinázok a BR során betöltött szerepének vizsgálatához az adott proteináz bontó hatását gátló szert használtunk. Hasonlóan – más kísérletsorozatok esetében – olyan anyagokat is használtunk, amelyek bizonyos jelátviteli folyamatok kulcsmolekuláit gátolják. Hogy meggyőződhessünk arról, hogy a vizsgálataink eredményei milyen mértékben tudhatók be a baktériumfertőzésnek, illetve a fecskendezésből adódó ozmotikus, illetve mechanikai stressznek, ezekben a kísérletekben kontrollként a baktériumszuszpenzió helyett vizet használtunk. Azokban az esetekben, amikor az adott anyag törzsoldatát annak oldhatósága miatt nem vízben, hanem más oldószerben (pl. etanol, dimetil-szulfoxid) oldottuk fel akkor kontrollként az adott oldószer megfelelő hígítását használtuk.

4.5. Kezelések és mintavétel

A vizsgálatokhoz teljesen kifejlett leveleket használtunk. Törekedtünk arra, hogy az egyes kísérletekben a levelek nagyjából azonos korúak legyenek, azonos levélemeletről (dohány) vagy a tőlevélrózsa hasonló fejlettségű leveleiből (*Arabidopsis*) származzanak. A mintákat két vagy több azonos módon kezelt növény(i szövetrész)ből keverve vettük. Amennyiben a kísérlet lehetővé tette

(illetve megkövetelte), hogy egyazon levélen, a másodlagos levélerek által határolt levéllemez-részeken különböző kezeléseket is végrehajtsunk, ügyeltünk arra, hogy a különböző kezeléseket különböző fejlettségű levéllemez-területeken végezzük, majd az ezekből vett mintákat még a feldolgozás előtt keverjük. RNS-kivonáshoz a mintavétel után a növényi részeket folyékony nitrogénben villámfagyasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk további feldolgozásig. A klorofillkivonással járó szövetfestési eljáráshoz a növényi részeket levétel után azonnal 70-96 %-os etanolba helyeztük.

4.5.1. A növény befecskendezése (infiltrációja)

A növény sejtközötti járataiba a baktériumszuspenziót, vizet és egyéb folyadékot tűvel (26 gauge) ellátott fecskendővel injektáltuk (Klement, 1990). *Arabidopsis*oknál hatékonyabbnak bizonyult, ha a levelet – az epidermiszén ejtett parányi seben keresztül – tű nélküli fecskendővel infiltráltuk.

4.5.2. Vírusfertőzések kivitelezése

A BR vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatásának vizsgálatokor a fertőzéshez *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' nn növényekről vett fiatal mozaikos leveleket használtunk. A leveleket mozsárban csapvízzel homogenizáltuk, majd az így nyert szuszpenziót egyszerűhasználatos vinil-kesztyűben kézzel vittük fel a fertőzendő levelek felszínére. A finom dörzsölés hatására letöredező növényi szőrök után maradó seb elegendőnek bizonyult a vírus növénybe jutásához.

Mivel a kompatibilis dohány-TMV kapcsolat esetén számolni kell a vírus növényen belüli mozgásával, szisztemizálódásával is, ezeknél a vizsgálatoknál külön-külön növényeket (*N. tabacum* L. 'Samsun' nn) fecskendeztünk vízzel, illetve baktériumszuspenzióval. A vizsgálatokba olyan növényeket is bevontunk pozitív kontrollként, amelyek csak vírussal fertőztünk. A HR gátlás vizsgálatánál (inkompatibilis növény-kórokozó kapcsolat) a levelek egyik felét vízzel, a másikat baktériumszuspenzióval kezeltük elő, majd a teljes levélfelületet fertőztük vírussal.

4.6. Növényi minták feldolgozása

4.6.1. Növényi mRNS kivonása, cDNS írása (génkifejeződési vizsgálatokhoz)

Az mRNS kivonásához kb. 100 mg növényi mintát folyékony nitrogénben, kerámiamozsárban homogenizáltunk, majd kereskedelmi forgalomban kapható RNS-tisztító termékkel (Total RNA Extraction Miniprem System – Viogen) vontuk ki belőle az RNS-t a gyártó utasításait követve. A folyamat során DNáz-kezelést is alkalmaztunk (RNase-Free DNase Set, Quiagen), hogy elkerüljük az esetleges DNS szennyezés zavaró hatását a későbbi valós idejű PCR vizsgálatokban. Mintánként 2,5 µg RNS felhasználásával RevertAid H Minus First Strand cDNS

Synthesis Kit (Fermentas) segítségével cDNS-t írtunk a gyártó utasításait követve. A vizsgálatok jellegétől függően random hexamer primert, illetve oligo (dT) primert használtunk az átíráshoz.

4.6.2. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű PCR-rel

A növényi mRNS-ről készült cDNS-t valós idejű PCR vizsgálatnak (Opticon MJ Real Time PCR) vetettük alá. Egy PCR reakcióhoz 15 µl reakcióelegyet használtunk, amely 2,5 µl tízszeresre hígított cDNS-ből, 1,5-1,5 µl indítószekvenciából (3 µM), 2 µl vízből és 7,5 µl reakciómixből (iQ SYBR Green 2× Supermix; Biorad) kevertünk. A kapott adatokat a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin gén kifejeződési szintjére normalizáltuk. Az így meghatározott génkifejeződési értékeket a kezeletlen növényekből (kontroll) származó eredményekhez viszonyítottuk.

4.6.3. A növényi minták előkészítése proteáz-aktivitás méréséhez

40 mg növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 1,5 ml-nyi, a 4.8. pontban felsorolt puffer valamelyikében alaposan felkevertük. Az elegyet két órán át rázatás közben jégen inkubáltuk, majd két percig 13 000 percenkénti fordulaton centrifugáltuk. 25 µl felülúszóból, 24,75 µl pufferből és 0,25 µl proteáz szubsztrátból egy méréshez szükséges reakciómennyiséget pipettáztunk össze egy 96-os real time PCR lemez egy-egy zsebébe. Negatív kontrollként a reakcióelegyből a növényi mintát kihagytuk, helyette pufferrel egészítettük ki 50 µl-re. Pozitív kontrollként a csomaghoz mellékelt tripszin szolgált.

4.6.4. Microarray vizsgálatok

A microarray vizsgálatokat Brazma és mtsai. (2001) által leírt MIAME (Minimum information about microarray experiment) követelmények alapján végeztük. Dohányleveleket vízzel, *P. syringae hrcC* baktériumszuszpenzióval, inhibitorral (1.5mM LaCl₃, 50 µM neomicin-szulfát, 100 µM arisztolochiasav, 1.5 µM K252a, 50 µM MG115), illetve baktériumszuszpenzió és inhibitor keverékével infiltráltunk. A cDNS címkézést, a hibridizációt és az adatok normalizálását a TIGR Potato Functional Genomics Project végezte a mintegy 12 000 burgonya gént tartalmazó TIGR Potato 10K cDNA Array felhasználásával.¹ A burgonya chip felhasználását a dohány és a burgonya közötti nagyfokú genetikai hasonlóság tette lehetővé. A TIGR által normalizált adatokból az ismétléseknél fellépő eltérő génkifejeződési szintek rangsorának mértani közepén alapuló ún. termék rangsor-analízissel (*rank product analysis*; Breitling és mtsai., 2004) választottuk ki azokat a géneket, amelyek működését a kezelések szignifikánsan serkentették vagy visszavetették. Azokat a géneket tekintettük megváltozott aktivitásúnak, amelyekben a változás mértéke meghaladt az 5%-os, véletlenszerű permutációból is előálló hibahatárt.

¹ Az alkalmazott protokoll a http://www.jcvi.org/potato/sol_ma_protocols.shtml oldalon található.

4.7. Kallózkimutatás

4.7.1. Kallózfelhalmozódás meghatározása szövetfestéssel

A sejtfalakba épülő kallóz kimutatásához anilin-kéket használtunk (Currier, 1957), amelyet 150 mM koncentrációjú pH 9,5 kémhatású K_2HPO_4 pufferben vettünk fel 0,1%-os koncentrációban. A forrásban lévő etanollal színtelenített *A. thaliana* leveleket 1,5 ml űrmértékű reakciócsövekben áztattuk a festékes pufferben egy éjszakán keresztül. A szövetmintákról a fölösleges festéket a fent leírt K_2HPO_4 pufferrel mostuk le. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz ($\lambda_{ex}=393$ nm és $\lambda_{em}=479$) a mintákat glicerolban fixáltuk tárgylemezen. A különböző kezelésekben részesített növényekből készített preparátumokon a fluoreszcencia mértékét, a kallózbeépülési gócok számát, méretét, elhelyezkedését az így készült fényképeken szabad szemmel vizsgáltuk. A megfigyeléseket egy ötfokozatú skálán osztályoztuk (erős csökkenés, enyhe csökkenés, változatlan, enyhe növekedés, erős növekedés). Kontrollnak a vízzel, illetve csak inhibitorral kezelt mintákat tekintettük.

4.8. Proteináz-aktivitás mérése dohányban

A proteináz-aktivitás méréséhez a SensoLyteTM Red Protease Assay gyári készletet (AnaSpec Co., San Jose, CA, USA) használtuk. A vizsgálatokhoz a gyártó által megadott összetételű puffereket készítettük el. A valós idejű PCR vizsgálatoknál is használt berendezéssel végeztük a proteináz-aktivitás méréseket, ötpercenkénti leolvasással, $\lambda_{excitációs} = 546$ nm és $\lambda_{emissziós} = 575$ nm egy órán keresztül.

4.9. A géncsendesítéshez kapcsolódó anyagok és módszerek

Szatellitvírussal kiváltott géncsendesítési rendszert (SVISS – *satellite virus-induced silencing system*; Gosselé és mtsai., 2002) használtunk. A felhasznált szatellitvírus (STMV) a dohánymozaik vírus U2 törzse (TMV-U2) volt. Az STMV-t tartalmazó pVE349 plazmidba olyan szekvenciákat tudunk elhelyezni PstI és NotI hasító enzimek segítségével, amelyek az általunk vizsgálni kívánt gének csendesítését eredményezik. A restrikciós emésztést az endonukleázokat és a hozzájuk tartozó puffereket gyártó cég (Fermentas) utasításainak megfelelően végeztük. Ezt követően a ligálás T4 DNS ligázzal történt egész éjszaka 4 °C hőmérsékleten. Az *in vitro*

4.9.1. Plazmidtisztítás

Egy éjszakán át folyamatosan forgatott, 37 °C-on folyékony LB táptalajon felszaporított *E. coli* baktériumokból a kívánt plazmidot Miniprep ExpressTM (Bio101, Vista, CA, USA) készlet segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.10. Dohányban a BR során aktivitást mutató gének ortológjainak keresése *Arabidopsis*ban

Dohányban aktivitást mutató – fehérjebontásért és jelátvitelért felelős – géneket *Arabidopsis*ban is kerestük. A munka során a SeqMan (LaserGene) programot, a Genevestigator (Zimmermann és mtsai., 2004) adatbázist és a SALK intézet honlapján elérhető (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) géntérképező alkalmazást használtuk fel.

4.11. A pVE349 plazmid bázissorrendjének meghatározása

A pVE349 kódjelű plazmid bázissorrendjét a plazmid vektor szabadalmi leírása (Metzlaff és mtsai., 2003) és Gosselé és mtsai. (2002) cikke alapján rekonstruáltuk *in silico* a SeqBuilder 7.0.0 program segítségével (DNASTAR, Madison, USA).

4.12. Statisztikai módszerek

Az ismételt kvantitatív vizsgálatok eredményeit átlagoltuk és ezeket független mintás (heteroszcedasztikus) t-próbával összehasonlítottuk. A konfidencia intervallumot $p > 90\%$ -ban határoztuk meg. Az adatokat – a szórások feltüntetésével – a hatékony megjelenítés szempontjából legalkalmasabb diagramtípusokon ábrázoltuk.

5. Eredmények

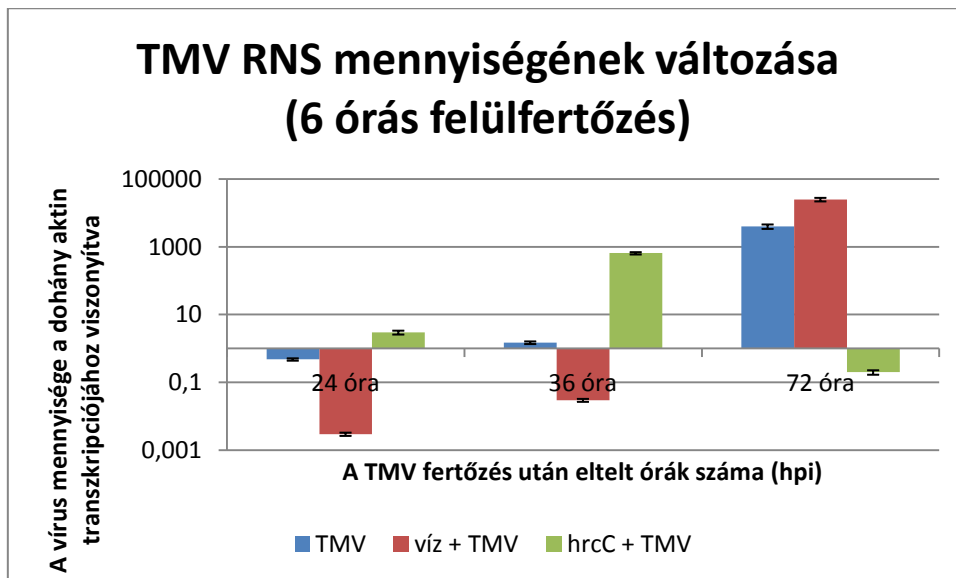
5.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása

5.1.1. A tünetek gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A baktériumfertőzés után mind a hat, mind a huszonnégy órával dohány mozaik vírussal (TMV) felülfertőzött növényeken csak kisebb mértékű mozaikosodás volt megfigyelhető a vízzel előkezelt, illetve a kezeletlenül hagyott kontrollnövényekhez képest (ábrán nem jelölve). Ebből arra következtethetünk, hogy a vízzel való injektálásnak is van hatása a tünetek kialakulására, még ha az kisebb mértékű is a baktériumfertőzés esetén tapasztaltnál.

5.1.2. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A dohánynövények inokulált leveleiben a baktérium által kiváltott BR hatására a TMV RNS kifejeződési szintje a vírusfertőzést követő második napon jelentős emelkedést mutatott, majd a harmadik napon erőteljesen csökkent a fertőzést hat órával (2. ábra), illetve 24 órával (ábrán nem jelölve) az előkezelések után elszenvedő növényekben.



2. ábra. A TMV mennyiségének változása Samsun nn növény inokulált leveleiben az idő függvényében kontroll (csak TMV kezelés), vízzel előkezelt [Víz + TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC + TMV] növényben. A vírusos felülfertőzések hat órával követték a baktériumos előfertőzést. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissza pedig a vírus, valós idejű PCR módszerrel meghatározott RNS kifejeződési szintjét, logaritmus skálán.

5.1.3. A vírus okozta HR gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

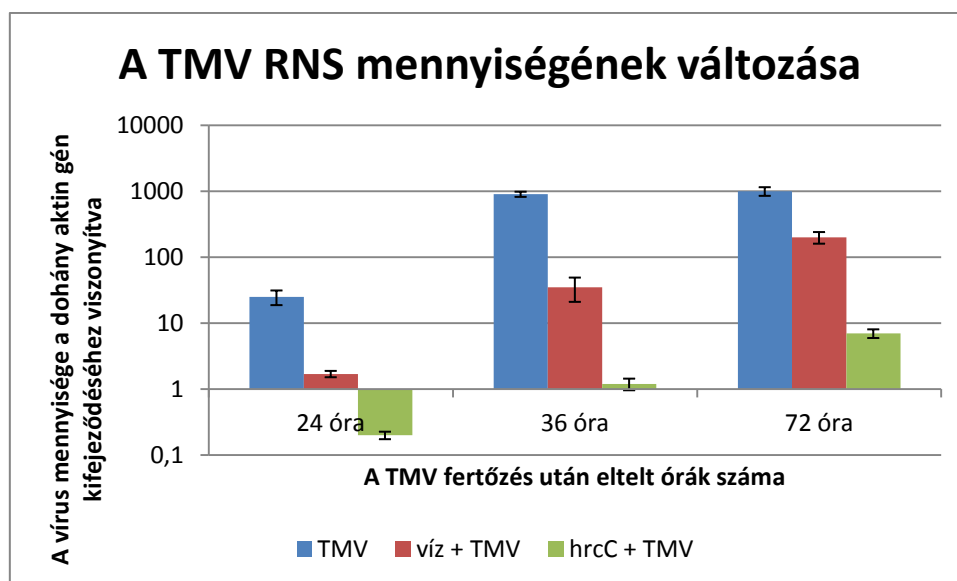
Azoknál a növényeknél, ahol az előkezelésektől hat óra telt el a vírussal való felülfertőzésig, a baktériummal előkezelt levélfeleken a HR gátlás mind a kontrollhoz, mind pedig a vizes kontroll levélfélhez képest szembeötlő volt. Nem csak a léziók száma, de azok mérete is jelentősen eltért az egyes kezeléseknél. Az előkezelések után egy nappal felülfertőzött növények esetében szintén erőteljes HR-gátlás mutatkozott, amely azonban nem csak a baktériummal, hanem a vízzel előkezelt levélfeleken is markánsan megmutatkozott. A nekروزisok mindkét előkezelés hatására 1 mm körűek voltak (3. ábra).



3. ábra. A baktériumok által kiváltott BR HR-gátló hatásának vizsgálatához használt *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN levelei a TMV okozta HR sejt-kollapszus bekövetkezése után. Az X-szel jelölt levél kezeletlen kontroll volt, míg a V jelűt vízzel, a C jelűt pedig *P. syringae* pv. *syringae hrcC* baktériumszuszpenzióval fecskendezték be hat órával a TMV fertőzés előtt. Az ábrán bemutatott levelekhez hasonló megjelenés volt megfigyelhető a kísérletbe vont többi növényen is.

5.1.4. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

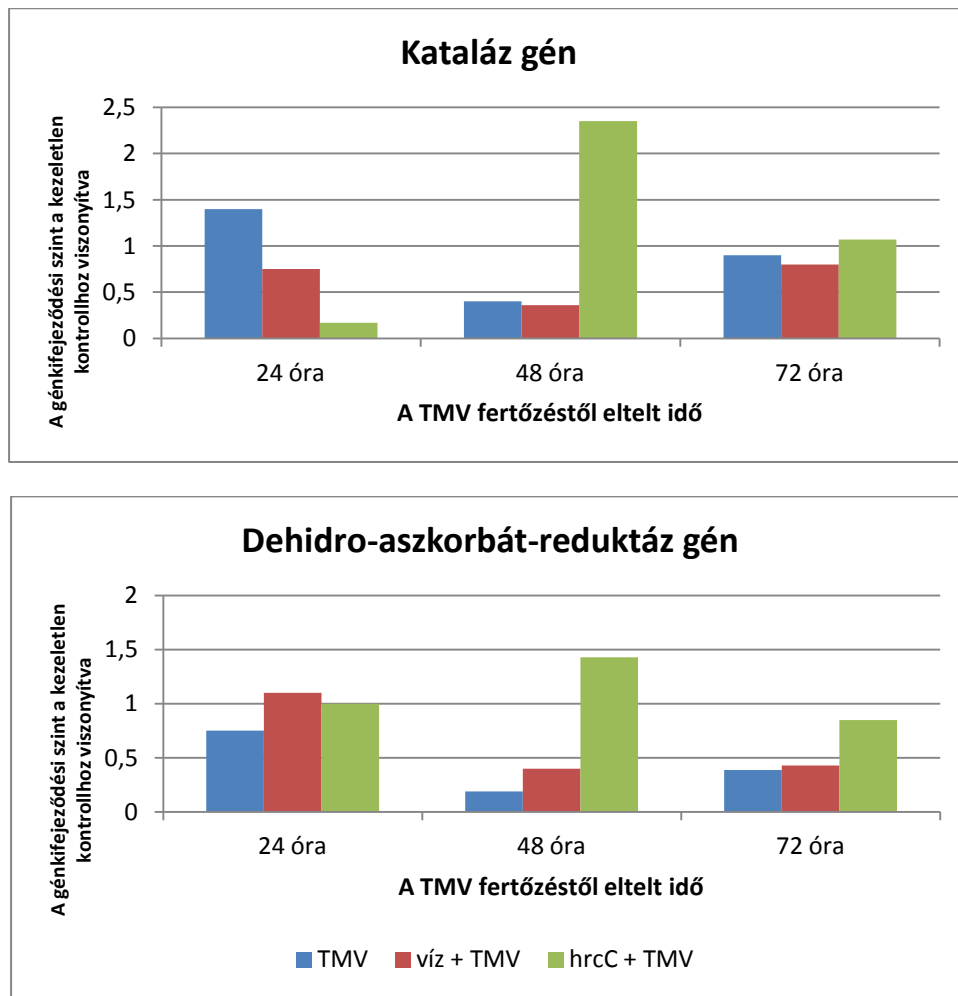
A vírusreplikáció gátlásának vizsgálatához az előkezelés után hat órával fertőztük felül a növényeket TMV-vel. Az eredményeket bemutató 4. ábrán megfigyelhető, hogy a vírus RNS mennyisége a növényben mindhárom kezeléstípus esetén folyamatosan emelkedik, azonban az emelkedés mértéke eltérő. A kontroll (csak TMV-vel fertőzött) növényhez képest a baktériummal előkezelt növényekben kisebb mértékű a vírusszint növekedése. A vízzel előkezelt mintákban is megfigyelhető ugyanakkor a vírusreplikáció kisebb mértékű gátlása.



4. ábra. A TMV mennyiségének változása Xanthi NN növényben az idő függvényében kontroll (csak TMV kezelés) [TMV], vízzel előkezelt [víz + TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC + TMV] növényben. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissza pedig a vírus RNS expresszióját, logaritmus skálán.

5.1.5. A növényi védekezési reakciókkal kapcsolatba hozható gének aktivitásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A vírusreplikációval kapcsolatos vizsgálatainkhoz használt mintákból bizonyos növényi védekezésben szerepet játszó gének aktivitásának változását is vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy ezek közül két antioxidáns szerepet betöltő gén (kataláz és dehidro-aszkorbát reductáz) kifejeződési szintje is a fertőzést követő 48. órában jelentősen megemelkedik a *hrcC* baktériummal előkezelt mintákban. Ez az emelkedés azonban nem tartós, a 72. órában már ennek az értéknek közel a felére esik vissza. (5. ábra).



5. ábra. Kataláz (NtCAT) és dehidroaszkorbát-reduktáz (NtDHAR) dohánygén transzkripciójának változása Xanthi NN növényben az idő függvényében a kontroll (csak TMV kezelés [TMV]; vízzel előkezelt [víz+TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC+TMV] növényben. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissza pedig a gén transzkripciójának mértékét jelöli a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az ábra két független, hasonló eredményt mutató kísérlet reprezentatív eredményét mutatja be.

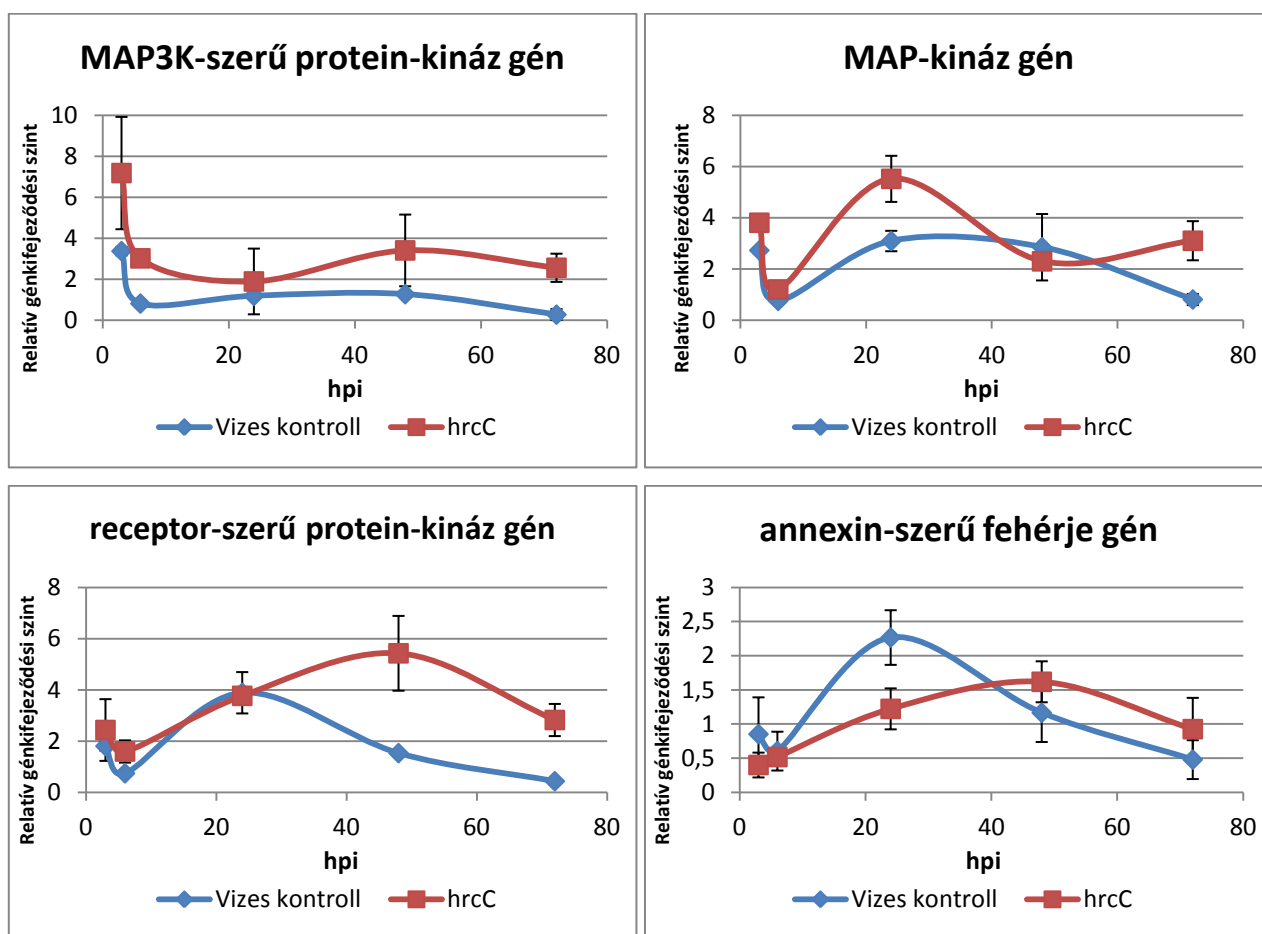
5.2. A BR során a jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő, megváltozott aktivitást mutató gének vizsgálatai

5.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt

Kutatócsoportunk korábbi munkáiban nagy számban azonosított olyan géneket, amelyek a BR során aktiválódnak dohánynövényben. Ezek között számos olyan szerepelt, amelyek a sejten belüli jelátviteli folyamatokban vesznek részt (pl. MAP-kinázok, foszfatázok, receptor-jellegű kinázok, Ca^{2+} -jelátvitelben szerepet játszó fehérjék, hormonszintézis-gének). A 6. ábrán néhány jellemző génaktivitás változást mutatunk be.

A MAP3K kináz jellemzően a korai időpontban (6hpi) mutatott nagyobb aktivitást a kontrollhoz képest. Valószínűleg a védekezés beindításában játszhat szerepet. Más gének – így a MAP-kináz vagy a receptor-szerű protein kináz génjei – a későbbi időpontokban (pl. MAP-kináz: 24 és 72 hpi; receptor-szerű protein kináz: 48 hpi) mutattak a kontroll vízzel kezelt levélszövethez képest nagyobb aktivitást a BR alatt. Olyan géneket is találtunk, amelyekben épp a baktériumos

fertőzés hatására csökkent a transzkripció a vizes kezelésen átesett mintában mérthez képest (pl. annexin-szerű fehérje: 24 hpi).



6. ábra. Különböző, BR-hez köthető jelátvitelben részt vevő gén kifejeződési szintjei *P. syringae* pv. *syringae* hrcC (piros vonal), illetve vízzel (kék vonal) infiltrált növényekben mérve a fertőzéstől eltelt órák (hpi – hours post inoculation) függvényében. A függőleges tengelyen relatív génkifejeződési szinteket mutatnak: a viszonyítási alapot egyrészt a növényi aktin gén, másrészt pedig a kezeletlen kontrollnövényekben mért génkifejeződési szint adja.

5.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

Vizsgálataink során a dohánynövények kezelését a fentiekben leírt baktériumszuspenzió és a vizes injektálás mellett olyan gátlószerekkel is kombináltuk, amelyek a munkánk szempontjából fontosabb jelátviteli útvonalak egyes elemeit képesek blokkolni, így a kalcium-beáramlást (lantán-klorid), a foszfolipáz-A2 (arisztolochiasav), foszfolipáz-C (neomicin-szulfát) és foszfolipáz-D (n-butanol) aktivitását, a fehérjék szintézisének (cikloheximid) és azok proteoszóma-bontásának (MG115) folyamatát. Ezen kezelések tizenhat BR marker gén aktivitásának változására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Azokat a fertőzés utáni időpontokat, amelyekben az adott gén aktivitása eltérést mutatott a tiszta, illetve az inhibitorral is kiegészített baktériumszuspenzióval való kezelés között egy mátrixba rendeztük (1. táblázat). Megállapítható volt, hogy egyes folyamatok kifejezetten a fertőzést követő korai időpontokban befolyásolták az egyes gének aktivitását (pl. a foszfolipáz-A2 a MAP-kináz, a MAP3K, az annexin-szerű és a PTS-fehérjét), míg mások inkább a későbbi mérési

időpontokban (pl. foszfolipáz-C gátlásának hatása a MAP-kinázra és a receptor-szerű kinázra). Volt azonban olyan kapcsolat is, amely a vizsgált időpontokban mindenütt eltérést mutatott (foszfolipáz-A2 gátlásának hatása a hősokk transzkripció faktor génkifejeződési szintjére).

1. táblázat. A bal szélső oszlopban található gének aktivitására a táblázatban jelzett időpontokban hatással volt a fejlécben felsorolt jelátviteli folyamatok gátlása. Az üresen hagyott mezőkben az adott génnél az adott kezelés hatására egyik kezelés utáni vizsgált időpontban sem volt eltérés a csak baktériummal, illetve a baktérium és a gátlószer kombinációjával végzett kezelés hatása között. (A fertőzéstől eltelt idő órában értendő, a n.a. jelölésű mintáknál nincs adat.)

	Kalcium-beáramlás	Foszfolipáz-A2	Foszfolipáz-C	Foszfolipáz-D	Fehérjeszintézis	Proteozóma
MAP-kináz		3	24-48	6	6	12
MAP3K	12-48	3	12	6	6	6
Receptor-szerű kináz	6		24		6-24	
PTS-fehérje		3-6				
Annexin-szerű fehérje	6	3	6-12	½-6	6	3-12
SPL						12
Hősok-fehérje	n.a.	½-48			n.a.	
Fahéjsav-4-hidroxiáz	n.a.	3-6		6	n.a.	
Epoxid-hidroláz	n.a.	3-6	48	12	n.a.	3-12; 48
Orto-metil-transzferáz	n.a.	3-6		3-6	n.a.	
Glicin-gazdag-fehérje	n.a.	6-48	24		n.a.	12-48
Glutation-S-transzferáz	n.a.	6	6	3	n.a.	3-6
Peroxidáz	n.a.	3-6	48	12	n.a.	3-6; 48
Cisztein-proteináz	n.a.	n.a.	n.a.	12	n.a.	n.a.
Ubikvitin-kötő fehérje	n.a.	n.a.	n.a.	3	n.a.	n.a.
Proteozóma ő-alegység	n.a.	n.a.	n.a.	12	n.a.	n.a.

A foszfolipáz-A2 és -D gátlásának az ebbe a vizsgálatba bevont BR gének aktivitásváltozására konzekvensen a korai időpontokban (12 óráig) volt hatása. Kivétel ez alól a glicin-gazdag fehérje génje, mely még a fertőzést követő 48. órában is aktivitásbeli eltérést mutatott a gátlószerrel kiegészített mintákban a BR-hez képest. Ezzel szemben a foszfolipáz-C gátlása, úgy tűnik, a különböző BR-génekre különböző időpontokban volt hatással: a fertőzést követő 6. órában gátolta a glutation-S-transzferáz, a 24. órában a glicin-gazdag fehérje, és a 48. órában a peroxidáz és az epoxid-hidroláz géneket. Hasonlóan szórtak a fehérjelebontás gátlása mellett vizsgált BR-gének aktivitásváltozásbeli eltérések időpontjai. Ez utóbbi kezelésnél érdekes ingadozás volt megfigyelhető mind az epoxid-hidroláz, mind pedig a peroxidáz esetében: a BR korai és késői szakaszaiban is nagyfokú eltérés mutatkozott a gátlószerrel kezelt és nem kezelt minták között.

Ugyanakkor az infiltrációt követő 24. órában a génaktivitás szintje mindkét minta esetében közel azonos volt.

5.2.3. Jelátvitelgátlók génkifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálatai microarray módszerrel

A fertőzést követő hatodik órától vett mintákban nagyszámú gént vizsgáltunk cDNS microarray módszerrel. Ezen gének közül azokat választottuk ki, amelyek aktivitásbeli eltérést mutattak azon gének esetében, amelyek ugyanezen vizsgálatok részeként a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrcC* mutánsával injektált levelekben a BR során szignifikánsan változtatták kifejeződési szintjüket (Szatmári Á. és Bozsó Z. nem publikált adatai). A vizsgálatokban négy különböző jelátviteli-, illetve egy fehérjelebontást és közvetve a szignál folyamatokat gátló vegyületet használtunk (LaCl₃ – kalcium-ion beáramlás; arisztolochiasav – foszfolipáz-A; neomicin-szulfát – foszfolipáz-C; K252a – kinázok; MG115 – proteozóma).

Az 547 BR-hez köthető gén 18%-áról (99) állapítottuk meg, hogy a fertőzést követő hatodik órában a jelátvitel-gátlók befolyásolják a működését. Az 2. táblázatban vetettük össze két-két kezelés hatását különböző gének aktivitásaváltozásának irányára. Az aktivitásváltozások iránya többnyire azonos volt a különböző kezelésekre. A legtöbb azonos irányba aktiválódó gént a protein kinázok, illetve a foszfolipáz-A2 gátlásának összevetésekor találtunk (28 gén). A foszfolipáz-C és a proteozómák gátlásakor szintén nagy számú (17) gén változtatta meg aktivitásának irányát ugyanolyan irányban.

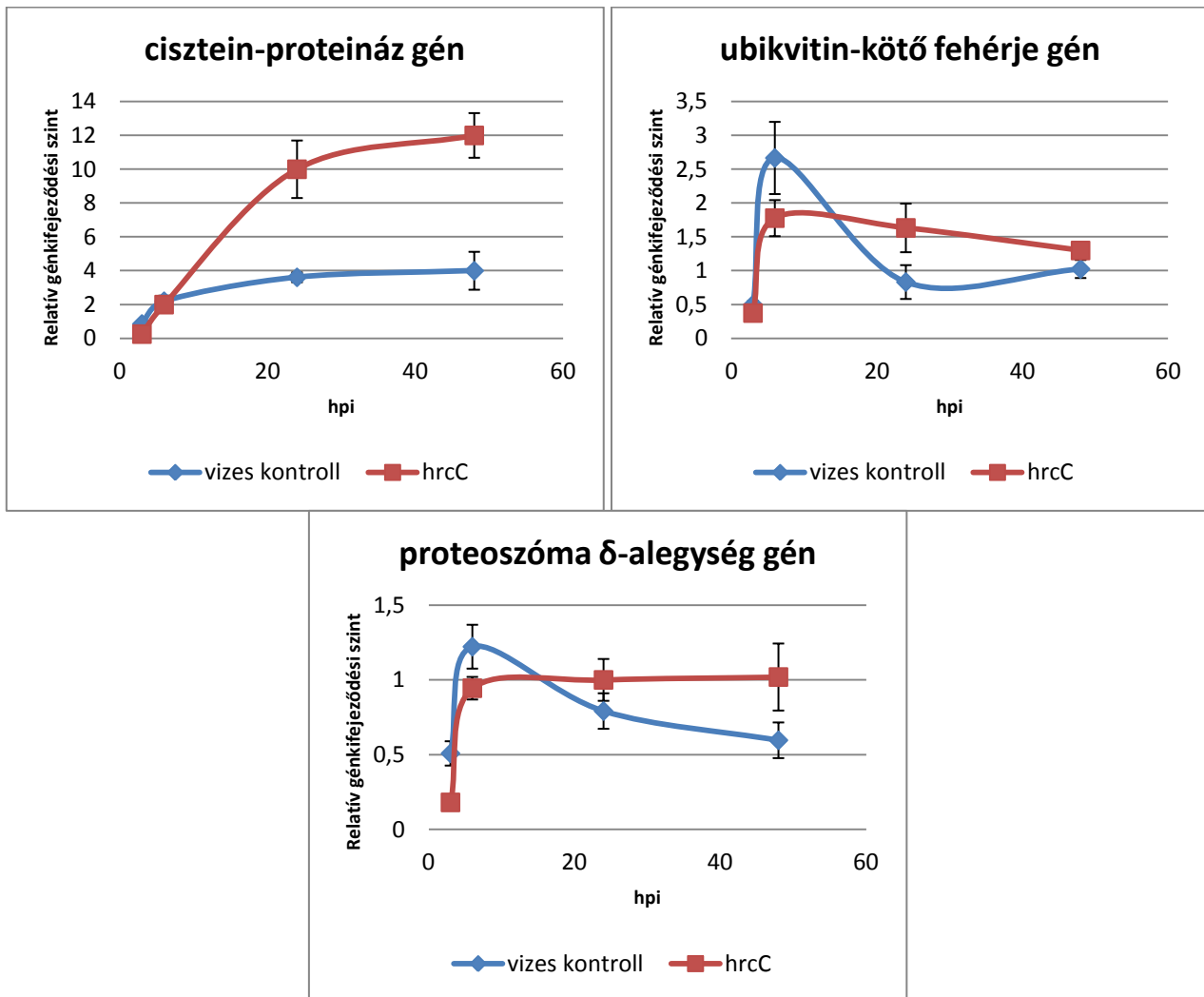
2. táblázat. A BR során megváltozott aktivitást mutató gének átíródás-változásainak iránya jelátvitelgátlók hatására a microarray eredmények alapján. Két-két különböző folyamat gátlásának hatására azonos irányba változó aktivitást mutató gének számai pirossal, az ellentétes irányúak zölddel vannak jelölve.

	Kalcium-beáramlás	Foszfolipáz-C	Foszfolipáz-A2	Protein kináz	Proteozóma	
Kalcium-beáramlás		9	3	5	7	Azonos irány
Foszfolipáz-C	0		8	10	17	
Foszfolipáz-A2	0	0		28	6	
Protein kináz	2	2	0		6	
Proteozóma	0	0	1	5		
Ellentétes irány						

5.2.4. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt

A jelátvitelben szerepet játszó gének vizsgálatához hasonlóan tanulmányoztuk a protein lebontásban szerepet játszókat. A három bemutatásra kiválasztott gén közül egy cisztein-proteináz, valamint egy proteozóma δ-alegység génje a fertőzést követő 12., míg egy ubikvitin-kötő fehérje génje a kezeléseket követő 3. órában mutatott eltérést a BR-t kiváltó baktériumszuszpenzióval, illetve a vízzel infiltrált minták között.

Legmarkánsabb különbséget a vizes kontroll és a baktériummal infiltrált növényi mintákban mért értékek között a cisztein-proteináz esetében kaptunk. Ez a cisztein proteináz késői szerepét jelzi a BR alatt. Olyan géneket is sikerült azonosítani, amelyek – legalábbis bizonyos korai időpontokban – csökkent aktivitást mutattak a BR alatt a vizes kontrollhoz viszonyítva. Ilyen volt például egy ugyanazon lebontási mechanizmus, különböző pontjaiban szereplő ubikvitin-kötő fehérje, valamint egy proteoszóma alegység-gén is (7. ábra).



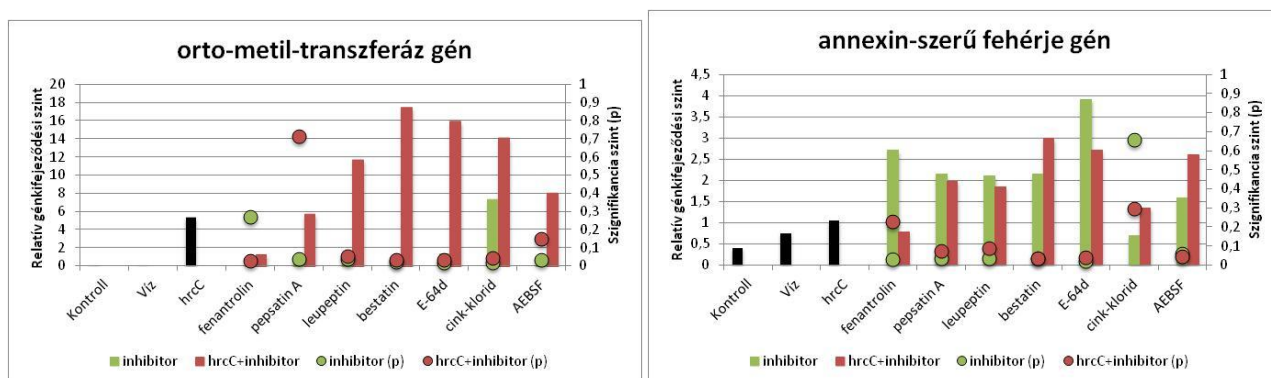
7. ábra. Néhány gén kifejeződési szintjei *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* (piros vonal), illetve vízzel (kék vonal) infiltrált növényekben mérve a fertőzéstől eltelt órák (*hpi* – *hours post inoculation*) függvényében. A függőleges tengelyen relatív génkifejeződési szinteket mutatnak: a viszonyítási alapot egyrészt a növényi aktin gén, másrészt pedig a kezeletlen kontrollnövényekben mért génkifejeződési szint adja.

5.2.5. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

A proteináz-gátlók hatásának vizsgálatához *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutánsának vizes szuszpenziójával együtt valamely proteináz gátlószerét is a növénybe fecskendeztük. A kezeléseket követő hatodik órában vett feldolgozott mintákban valós idejű PCR segítségével mértük a génkifejeződés változását. A vizsgálatba bevont legtöbb gén esetében azt tapasztaltuk, hogy kifejeződési szintjeik többnyire magasabbak voltak a BR korai szakaszában a legtöbb gátlószerrel

való kezelés hatására, mint azok alkalmazása nélkül. Különösen igaz volt ez az összefüggés a cisztein- és szerin-proteázgátlók használata esetén.

A vizsgált 14 gén aktivitásváltozását vizsgálva különböző irányú változások voltak megfigyelhetőek az inhibitorok hatására. Például az orto-metil-transzferáz esetén a metalloproteináz-gátló fenantrolin önmagában nem okozott eltérést a gén kifejeződésében a vizes kontrollhoz képest, ugyanakkor a *hrcC* szuszpenziót kiegészítve jelentősen csökkentette az expressziót. Ugyanakkor ez a gátlószer az annexin szerű fehérje génjét önmagában növénybe fecskendezve serkentette, baktériumszuspenzióval együtt azonban nem eredményezett számottevő változást. A cisztein proteinázokat gátló cink-kloridnak mindkét kezeléskombinációban hatása volt az OMT gén aktivitására, míg az annexin-szerű fehérje génkifejeződését csak kevésbé érintette (8. ábra)



8. ábra. A BR korai szakaszában (fertőzést követő 6. óra) két, a védekezésben kulcsszerepet játszó gén aktivitásának alakulása különböző proteázgátlók hatására. A vizsgált gének kifejeződési szintjét a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin génkifejeződési szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk (függőleges tengely). Az egyes gátlószereket a vízszintes tengelyen tüntettük fel (fenantrolin: metalloproteináz, pepsatinA: asparaginsav-proteináz, leupeptin: cisztein- és szerin-proteináz, bestatin: aminopeptidáz, E-64d és cink-klorid: cisztein-proteináz, AEBSF: szerin-proteináz). A kontroll minták értékei fekete, a csak inhibitorral kezelték zöld, az inhibitor-*hrcC* mutáns keverékkel kezelték piros színnel kerültek jelölésre. A másodlagos függőleges tengelyen a t-próbák szignifikancia szintjeinek értékei láthatóak (az inhibitoros kezeléseket a vizes kontrollal, az inhibitor + *hrcC* kezeléskombinációt a *hrcC* kontrollal vetettük össze). A könnyebb áttekinthetőség érdekében az ábrán a szórások nem szerepelnek. Ezek értéke 8-15% között mozgott.

5.2.6. Sejtfaali kallózbeépülés változása a proteínázgátlók alkalmazásának hatására *Arabidopsis*ban

Arabidopsis növényekben *hrcC* baktériumszuspenzióval BR-t váltottunk ki, majd a fertőzést követő 24., illetve 48. órában anilin-kékel megfestettük a sejtfaalba épülő kallózt. A különböző proteínázgátlók hatását önmagukban a vízzel, baktériumszuspenzió kiegészítéseként pedig a baktériummal infiltrált levelekben megfigyeltekhez viszonyítottuk. Azt vizsgáltuk, mely kezelések hatására, milyen irányban változik a kallóz beépülésének mértéke. Összességében megállapítható, hogy ahol változás volt a kontrollokhoz képest, az inhibitorok önmagukbani használata a kallózbeépülés fokozódását, az inhibitorral kiegészített baktériumszuspenziós kezelés pedig a kallózcocok számának csökkenését eredményezte (3. táblázat).

3. táblázat. A kallózbeépülés alakulása különböző proteínázgátlók hatására 24, illetve 48 órával a kezelést követően. A csak gátlószerral kezelt növények számára a kontrollt a vízzel infiltrált, a baktérium-gátlószer kombinációjával kezelt növények számára pedig a baktériummal fertőzött növények jelentették. Szürkével azok az esetek vannak feltüntetve, ahol nem mutatkozott jelentős eltérés a kontrollhoz képest. Világoszöld szín jelzi a kontrollhoz viszonyított kevesebb, sárga pedig a több kallózbeépülést. Sötétzöld jelöli azokat az eseteket, ahol jelentősen kevesebb kallóz épült be a sejtalba. (Magyarázatot lásd a szövegben.)

	Mintavétel a kezelés után 24 órával		Mintavétel a kezelés után 48 órával	
	Inhibitor	Baktérium + Inhibitor	Inhibitor	Baktérium + Inhibitor
Pepstatin				
Leupeptin		enyhén csökkent	enyhén nőtt	
Bestatin				
E-64d	enyhén nőtt			
AEBSF	enyhén nőtt	enyhén csökkent	enyhén nőtt	enyhén csökkent
Cink-klorid		enyhén csökkent		enyhén csökkent
TPCK	enyhén nőtt		enyhén nőtt	
E-64	enyhén nőtt			
Jodo-acet-amid		erősen csökkent	enyhén nőtt	enyhén csökkent
NEM		erősen csökkent		enyhén csökkent
Aprotinin		enyhén csökkent		
PMSF				

5.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálatához szükséges módszerek kidolgozása

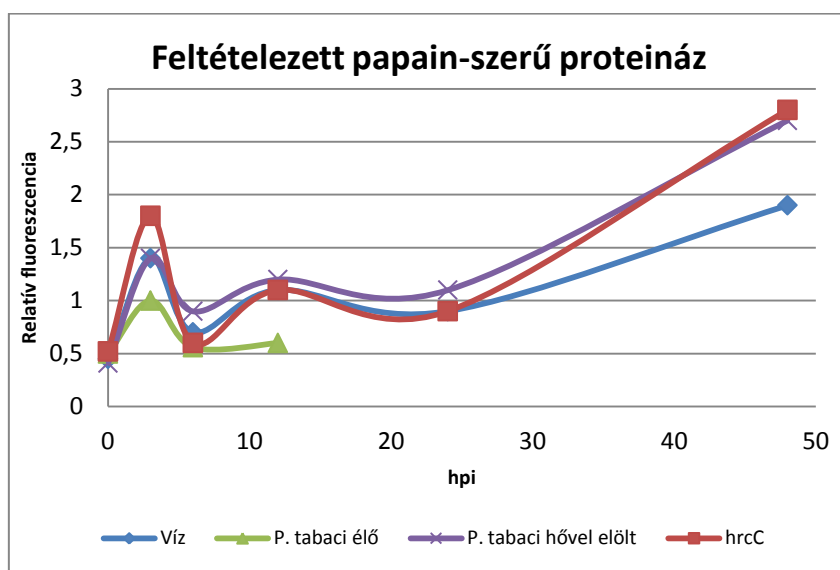
5.3.1. Proteináz-aktivitás mérése

Céljaink közt szerepelt, hogy a proteínázgátlók BR-génekre gyakorolt hatásainak vizsgálata mellett a növényekben aktívan működő egyes proteínázok aktivitását is mérjük az általános védekezés ideje alatt. Ehhez állati és humán proteínáz-aktivitás méréshez alkalmazott készletet² szerettünk volna a saját kísérleti körülményeinkhez alkalmazkodva használni. A különböző proteínáz-aktivitások dinamikájának méréséhez *N. tabacum* 'Samsun' növényeket vízzel, kompatibilis gazda-kórokozó kapcsolat kialakítására képes *P. syringae* pv. *tabaci* baktériumszuszpenzióval, ugyanezen baktérium hővel előlt sejtjeiből, illetve *P. syringae* pv. *syringae hrcC*-ből készült szuszpenzióval infiltráltunk. Kontrollként egyes növényeket kezeletlenül

² SensoLyte™ Red Protease Assay Kite (AnaSpec Co., San Jose, CA, USA)

hagytunk. A gyártó által papain proteináz méréséhez javasolt puffer használatával kaptuk az első eredményeket.

A vizsgált proteináz aktivitásának dinamikája a kezeléseket követő időszakban hasonló. A fertőzést követő 3., illetve 48. órában igen magas a többi időponthoz viszonyítva. A betegség tünetek kialakítására alkalmas *P. syringae* pv. *tabaci* fertőzés után 12 órával a proteináz aktivitás mértéke számottevően lecsökken a többi kezelés hatásához képest, holott a leveleken tüneteket csak pár órával később lehet megfigyelni. A legnagyobb különbségeket a vízzel kezelt, illetve a baktériumszuszpenziókkal infiltrált levelekben mért proteináz-aktivitás értékei között a második napon mértünk (9. ábra).

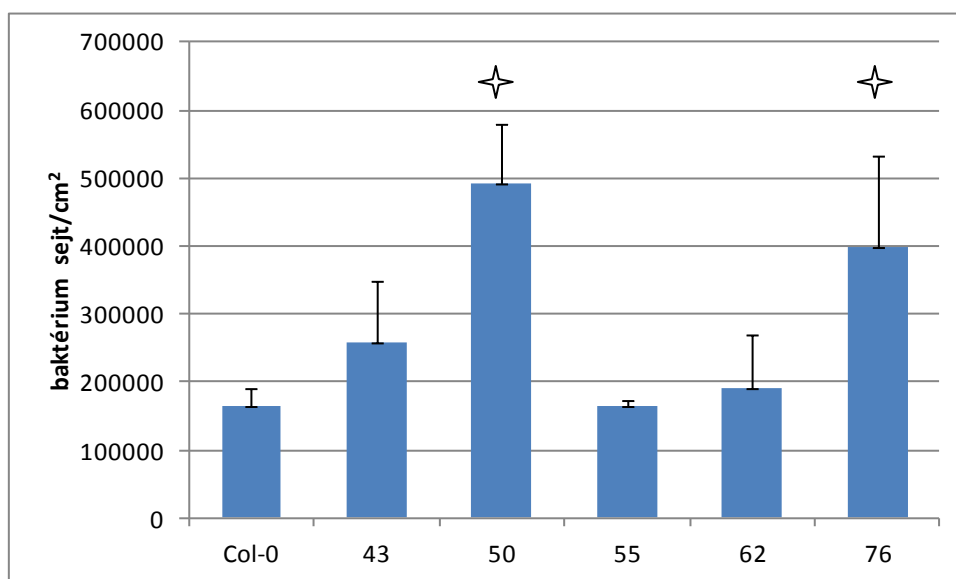


9. ábra. Papainnal azonos pH optimummal rendelkező proteinázok aktivitási dinamikája dohányban különböző kezelések hatására a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, egységnyi levéltömegre vonatkoztatva. A vízszintes tengelyen a fertőzéstől eltelt órák száma látható, a függőlegesen pedig a proteináz aktivitással arányos relatív fluoreszcencia értékek. A kezelések leírását lásd fentebb a szövegben. Az egyes értékek három minta átlagát jelölik. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szórásból származó hibahatárok nincsenek feltüntetve (0,01 és 0,09 közé tehető).

5.3.2. *Arabidopsis* modell alkalmazása funkcionális genomikai vizsgálatokhoz

Közel nyolcvan (78 db), bizonyos proteinázokra nézve T-DNS mutáns *Arabidopsis* növény magját rendeltünk a Nottinghami *Arabidopsis* Törzsgyűjteményből a majd ezeket elvetve és ebből a növényeket felnevelve baktériumfertőzésre teszteltük őket *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzsszel, amely egy lumineszkáló (ún. lux) gént hordoz (Fan és mtsai., 2008). A lumineszcencia változásából így arányosan tudtunk a baktériumszám változásának mértékére következtetni. Ez alapján ki tudtunk választani néhány olyan mutáns növényt, amelyben a baktérium kiváltotta lumineszcencia az ismétlésekben nagyobb valószínűséggel mutatott magasabb vagy alacsonyabb értéket a kontroll növényekhez képest. Ezeket részletesebb baktériumszaporodási kísérleteknek vetettük alá.

Az 10. ábrán 50-es számmal jelölt (karboxipeptidáz, At1g73270) és a 76-os (szubtiláz, AT4G10540) mutáns növényben szignifikáns baktériumszám különbséget tudunk kimutatni a vad típusú növényhez képest a fertőzést követő harmadik napon.

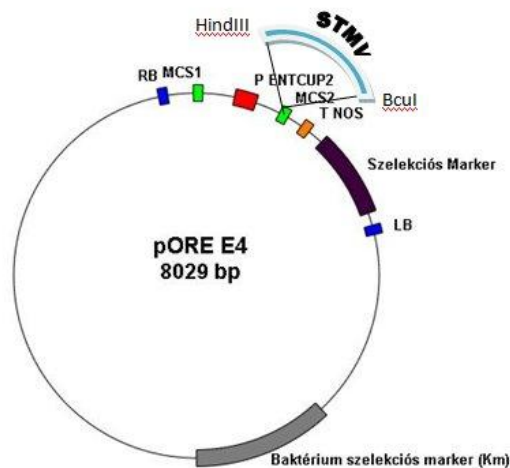


10. ábra. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 kompatibilis baktérium sejtszáma vad (Col-0) és protein lebontásban részt vevő mutáns (43, 50, 55, 62, 76) *Arabidopsis* növényekben. A baktériumokat 10^5 sejt/ml koncentrációban injektáltuk a levelekbe, majd a 3. napon levélkorongokat vágunk ki majd hígítási és tenyésztési módszerrel meghatároztuk a szövetben lévő baktériumok számát. A csillagok a Col-0 kontrolltól szignifikánsan eltérő ($P < 0,01$) mutáns növényeket jelölik. A hibavonalak a szórást jelölik. A kísérletet kétszer ismételtük meg hasonló eredménnyel.

5.3.3. *Agrobacterium* vektor konstrukció létrehozása az STMV szatellit vírus átmeneti expressziójához növényi szövetben

Az előző pontban ismertetett, *Arabidopsis*okra alkalmazható módszer mutánsok hiányában, dohány esetében csak nehezen lenne megvalósítható. Éppen ezért itt vírus által kiváltott géncsendesítés (VIGS – *viral induced gene silencing*) módszerét szerettük volna bevezetni. Ehhez a Gosselé és mtsai. (2002) által kidolgozott, ún. SVISS-t (*satellite virus induced silencing system*; szatellit vírussal kiváltott géncsendesítési rendszert) illesztettük a saját vizsgálatainkra.

A fertőzéshez szükséges STMV szatellit vírus RNS-t *in vitro* transzkripcióval állítottuk elő, ami egyrészt költséges, másrészt a termelt RNS sérülékeny és nehezen kezelhető. Ezeket a hátrányokat kiküszöbölendő a szatellit vírust (az üres, és a levelek fehéredését okozó PDS (fitoén-deszaturáz) génszakaszt hordozó változatot) egy *Agrobacterium* bináris vektorba építettük (11. ábra). A vírust kódoló DNS szakaszt így az *Agrobacterium* segítségével a növénybe juttattuk, ahol a bináris vektorról íródott át a vírus RNS-e.



11. ábra. Az STMV-t kódoló génszakasz beépítése pORE E4 bináris *Agrobacterium* plazmidba (részletek a szövegben). RB: a T-DNS jobb oldali határa, LB: a T-DNS bal oldali határa, MCS: sok klónozó hely, pENTCUP2: növényi promóter, T NOS: terminátor, szelektációs marker: növényi szelektációs marker kanamicin, Baktérium szelektációs marker: kanamicin.

A fertőzés után három héttel a fiatalabb Samsun növényeken az ér mentén a PDS géndarab által kiváltott fehéredést tapasztaltuk (12. ábra).



12. ábra. *N. tabacum* cv. „Samsun” nn növény üvegházban, erős napfény sugárzás mellett a fitoén-deszaturáz gén csendesítése után három héttel. A csendesítéshez használt konstrukció leírását lásd a szövegben.

5.4. Új tudományos eredmények

1. A *P. syringae* pv. *syringae* HR-negatív mutánsával kiváltott általános védekezés (BR) képes mérsékelni egy későbbi dohány mozaik vírussal történő felülfertőzés tüneteit késleltetni, illetve mérsékelni kompatibilis vírus-növény kapcsolat esetén, valamint csökkenteni a HR nekrotizisok számát inkompatibilis kapcsolatnál. A BR szintén gátló hatással van a TMV replikációjának mértékére.
2. Hidrogén-peroxidot ellensúlyozó antioxidáns gének indukálódnak a BR késői stádiumában (48 hpi) TMV felülfertőzés esetén, ami hozzájárulhat a vírus hatására kialakuló léziók visszaszorításához.

3. Több, kutatócsoportunk által korábban azonosított, elsősorban jelátviteli folyamatokhoz, illetve fehérjeanyagcseréhez kapcsolható BR-gén transzkripciós aktivitásának időbeli változását sikerült nyomon kövönnünk. Így megállapítható, hogy a BR ideje alatt melyik gén termékei mely időszakokhoz köthetők.
4. Hat különböző jelátviteli utat gátolva megállapítottuk, hogy a foszfolipáz-A2 és -D útvonal gátlása jellemzően korai változásokat eredményezett az általunk vizsgált 16 BR markergén transzkripciós mintázatában, a foszfolipáz-C gátlása ugyanakkor inkább kései génexpressziós eltérésekhez vezetett.
5. Hét különféle hatású proteinázgátló vegyület segítségével kimutattuk, hogy a fehérjék lebontásában részt vevő faktorok jellemzően negatív regulátorai a BR során dohányban fellépő korai transzkripciós változásoknak. Hasonló kísérletben tizenkét proteináz inhibitor felhasználásával megállapítottuk ugyanakkor, hogy a proteinlebontásban érintett faktorok serkentik az *Arabidopsis* levelek BR során bekövetkező későbbi kallóbeépülését.
6. Burgonya cDNS chip felhasználásával jellemeztük öt jelátviteli út gátlásának hatását a BR korai (6 hpi) transzkripciós mintázatára, kimutatva 99 BR-ben érintett gén szabályozásának kapcsolatát az említett öt jelátviteli út valamelyikével.
7. Növényi aktív proteináz mérésel alátámasztottuk, hogy egy feltételezett papain-szerű (cisztein-) proteináz feldúsul a dohánylevelekben a BR ideje alatt.
8. *Arabidopsis* mutánsok vizsgálatának segítségével azonosítottunk két szerin-proteináz gént (karboxipeptidáz és szubtiláz), amelyek valószínűleg pozitív regulátor szerepet töltenek be *Arabidopsis*-ban a BR alatt.
9. A SVISS-t (*satellite virus-induced silencing system*; szatellitvírus indukálta géncsendesítés rendszere) alapul véve új TMV szatellit vírus (STMV) expressziós- és csendesítő konstrukciókat fejlesztettünk ki funkcionális genomiakai vizsgálatok céljára.

6. Következtetések és javaslatok

6.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása

Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk használt általános védekezést kialakító, de HR-t nem okozó baktériummal előkezelt levelekben a vírus által kiváltott tünetek mérséklődtek (kompatibilis kapcsolat), illetve a vírus okozta hiperszenzitív válaszként megjelenő nekروزisok száma is csökkent. Emellett azt is megállapítottuk, hogy a vírus RNS mennyisége, azaz a vírus replikációja is mérsékeltebb volt a baktériummal előkezelt szövetekben.

Ennek háttérében az állhat, hogy a különböző típusú (baktérium, gomba, vírus) kórokozókra adott védekezési reakciók között is sok hasonlóság van – sőt, az abiotikus és biotikus stresszre adott válaszok is tartalmaznak átfedéseket. Erre jó példa a sebzésre mint mechanikus stresszre adott növényi válasz, amely részben megegyezik a patogénekre adott reakciókkal (Cheong, 2002). A védekezési reakciók e fajta átfedése miatt lehetséges, hogy a baktérium a vírus elleni védekezési folyamatokat is aktiválja. Ennek lehet az a magyarázata, hogy a növények esetében még nem fejlődött ki az egyes kórokozókra adott speciális válasz képessége. De elképzelhető az is, hogy a növény szempontjából ez a stratégia bizonyult hatásosabbnak, hiszen az egyik stresszfaktor megjelenése lehetőséget adhat más faktorok érvényesülésére (pl. a sebzés a kórokozók megtelepedésére és felszaporodására). Ez a fajta általános válasz azonban nem tartható fenn sokáig, hiszen nagy energiaigénye folytán kimerítené, és más stresszekkel szemben védtelenné tenné a növényt. Az eddigi vizsgálatok is azt mutatják, hogy az általános védekezési folyamatok korai, széleskörű szakasza csak átmeneti; kb. egy napon belül lezajlik.

Azt, hogy a baktérium indukálta BR milyen módon gátolja a vírust és az általa kiváltott tüneteket csak feltételezni tudjuk. Ez történhet a vírusreplikáció vagy a vírusterjedés akadályozásával. A vírushatás gátlása végbemehet pl. a vírus replikáció akadályozásának vagy a vírus RNS lebontásának segítségével. Ennek eszköze lehet a vírusok elleni védekezésben fontos szerepet játszó géncsendesítés „silencing” jelensége (Waterhouse és mtsai., 1999). A vírus terjedésének gátlásában nagy szerepe van a plazmodezmák átjárhatóságának szabályozásának. Az átjárhatóságot többek között a kallóz plazmodezmákban történő lerakódása befolyásolja (Roberts és Oparika, 2003; Beffa és mtsai., 1996; Wenlong és mtsai., 2012).

Az antioxidáns enzimek aktivitásváltozása azt sugallja, hogy a baktériummal előkezelt szövetekben a vírushatás egy szakaszában a hidrogén-peroxid lebontása jelentősebb lehet. A hidrogén-peroxid fiziológiás koncentrációban önmagában ugyan nem tud növényi sejthalált kiváltani, de más molekulákkal pl. a nitrogén-monoxiddal együtt igen (Delledonne és mtsai., 1998). Az alacsonyabb hidrogén-peroxid szint így gátolhatja a sejthalál kialakulását (a nekrozisok létrejöttét), de más módon – pl. más védekezési folyamatok szignálmolekulájaként – is megváltoztathatja a védekezési reakció kimenetelét (Hafez, 2005).

6.2. A BR során megváltozott aktivitást mutató jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő gének vizsgálatai

6.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt

A MAP-kinázok gének aktivitásának időbeli változása feltételezhetően visszavezethető arra, hogy az erős ozmotikus hatásból származó stressz ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat indítja el. A

fertőzés későbbi szakaszában azonban már előtérbe kerülhetnek olyan folyamatok, amelyek a baktériumra specifikus választ eredményeznek. Az olyan gének, amelyek kifejeződési szintjei magasabbak voltak a csak vízzel kezelt növényekben, mint a baktériumos fertőzést kapókban, egyfajta negatív szabályozási mechanizmusra világíthatnak rá. Az általunk vizsgált annexin-szerű fehérje génjének a fertőzés 24. órájában mért (vizes kontrollhoz képesti) alacsony szintje a foszfolipáz-A2 (PLA2) vagy -C (PLC) által szabályozott jelátviteli utak fokozott aktivitására engedhetnek következtetni, különösen annak fényében, hogy állatoknál igazolt az annexinek foszfolipáz-A2 gátló hatása (Parente és Solito, 2004).

6.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

Az, hogy a jelátviteli géneknél az arisztolochiasavas és butanolos kezelések többnyire a 3 és 6 órás időpontokban okoztak feltűnő eltérést a BR-ben mért értékekhez képest, alátámasztja, hogy a foszfolipáz-A2 és a foszfolipáz-D a fertőzést követő korai időpontokban játszanak szerepet. Megállapítható továbbá, hogy több kináz és az annexin-szerű fehérje a legtöbb BR alatt aktiválódó jelátviteli útban szerepet tölt be. Az, hogy az annexin-szerű fehérje génjének aktivitására minden gátlószer hatással volt (nem csak a PLA2-é!), bizonyítékul szolgálhat a jelátviteli utak közötti szoros kapcsolatra. Az egyik „összekötő kapocs” akár maguk az annexin-szerű fehérjék is lehetnek, figyelembe véve – az egyébként foszfolipáz-C-vel összefüggésbe hozható – foszfatidil-inozitolhoz való erős kötőképességüket (Hoshino és mtsai., 1995). Az, hogy az arisztolochiasav a fertőzést követően végig befolyással volt a hősokk fehérje, és a sejtfaik fontos strukturális elemeként szolgáló glicin-gazdag fehérje (Ringli és mtsai., 2001) kifejeződésére, jelzi, hogy a foszfolipáz-A2 a MAP-kináz kaskádokon túl is meghatározó szerepet játszik a sejtvédelemben. A PLA2-vel és a PLD-vel szemben a PLC szinte minden vizsgált gén kifejeződésére a fertőzést követő késői időpontokban hatott, ami azt sejteti, hogy a PLC által irányított jelátvitel szerepe a védekezési folyamatok fenntartásában lehet jelentős. Eddigi vizsgálataink alapján úgy tűnik, a „bontásra ítélt” fehérjék ubiquitinizációja már a fertőzést követő korai időpontban megkezdődik – legalábbis ami a PLD útvonalához kapcsolható. Ugyanakkor a PLD-nek csak valamivel későbbi (12. órában) van szerepe az általunk vizsgált cisztein-proteináz és a proteoszóma egyik alegységének génjére. A fertőzést követő 6. órában vett mintákból készített microarray módszer eredményeit értékelve, arra a megállapításra juthatunk, hogy a PLA2 és a protein kinázok, valamint a PLC és a fehérjebontási folyamatok ugyanazon, vagy egymáshoz szorosan kapcsolódó útvonalakban szerepelnek.

6.2.3. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt

Míg az általunk vizsgált cisztein-proteináz a baktérium által kiváltott BR alatt a vizes kontrollhoz képest azonos szinten (3., 6. óra) vagy erősebben (24., 48. óra) expresszáldott, addig a másik két fehérjebontáshoz köthető gén aktivitási szintje egyfajta ingadozást mutat. Úgy tűnik, a

fertőzést követő 6. órában ezeknek a működése inkább gátolt a BR alatt, míg fokozott működésükkel inkább a BR későbbi szakaszaiban vesznek részt a nem kívánt fehérjék bontásában.

6.2.4. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

Számos proteinázgátlóval végeztünk vizsgálatokat, melyek jelentős része az egyébként is védelmi szerepeket betöltő cisztein-proteinázok, illetve szerin-proteinázok (van der Hoorn, 2008., Baek és Choi, 2008) közül kerültek ki. Ezen irodalmi adatokat vizsgálataink is megerősíteni látszanak: legmarkánsabb különbségeket a génaktivitások változásában (a BR, illetve a megfelelő inhibitorral kiegészített BR-t kiváltó baktériumszuszpenzióval elért hatás között) épp e két csoportot gátló szerek adták. A fertőzést követő hatodik órában végzett mérések ugyanakkor azt is alátámasztják, hogy bizonyos folyamatokban más csoportba tartozó proteinázoknak is fontos szerepük lehet. A metalloproteinázokról feltételezhetjük, hogy negatív regulációs szerepet töltenek be az általunk vizsgált jelátviteli folyamatokban.

6.2.5. Sejtfalli kallózbeépülés változása a proteinázgátlók alkalmazásának hatására

Tapasztalataink alapján ezeknél a vizsgálatoknál csak a cisztein-, és szerin-proteinázok gyakoroltak bármiféle hatást a kallózberakódásokra a kontrollokhoz képest. Az, hogy – kisszámú kivételtől eltekintve – a 24. és 48. órában vett mintákban is hasonló volt a kallózbeépülés mértékének iránya az egyes kezelések hatására jelzi, hogy a sejtfalli megerősítése az általános védekezés viszonyain belül hosszabb távú folyamat, és ebben bizonyos proteináz típusok mindvégig fontos szabályozó szerepet játszanak.

6.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálataihoz kidolgozott módszerek értékelése

6.3.1. Proteináz-aktivitás mérése

Kísérleteink eredményei az mutatják, hogy a BR alatt a génkifejeződések szintjén jelentkező fokozott cisztein-proteináz aktivitás a ténylegesen működő enzimek tekintetében – legalábbis az általunk vizsgált feltételezett papain-szerű proteináz esetén – is érvényre jut.

6.3.2. *Arabidopsis* modell alkalmazása

Különböző proteináz géneket nem kifejező *Arabidopsis* vonalakon végzett előzetes vizsgálatok arra világítanak rá, hogy a szerin típusú aktivitással rendelkező szubtiláz és karboxipeptidáz génekre nézve mutáns növények sejtközi járataiban szaporodtak legnagyobb mértékben a kompatibilis *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 baktériumok. Ez azt sugallja, hogy mindkét gén a védekezés pozitív regulációjában játszhat szerepet. Védekezésben betöltött funkciójuk vizsgálata a későbbi kísérletek feladata.

6.3.3. Géncsendesítés dohányban (*N. tabacum*)

A Gosselé és mtsai. (2002) által kidolgozott SVISS (Satellite virus induced silencing system) a kutatási igényeinknek megfelelően átalakított konstrukciójának alkalmazásakor számos nehézségbe ütköztünk. Legnagyobb problémát az *in vitro* transzkripcióval előállított szatellitvírussal való körülményes munka jelentette. Általában elmondható volt, hogy a közvetlenül ezzel az RNS-sel való fertőzés csak szerény eredményeket hozott. A hatékonyság viszont nagyban javítható volt a csendesítés fenotipikus megjelenését mutató (*PDS* gén esetén kifehéredő levél) növényi mintából nyert inokulummal való további passzálással.

A hatékonyság növelésére az általunk előállított (a megfelelő hasítóhelyekkel rendelkező) STMV-t tartalmazó *Agrobacterium* pORE4 plazmid felhasználásával készített vektor konstrukció bizonyult a legjobb megoldásnak.

7. Összefoglalás

A növények természetes körülmények között folyamatosan ki vannak téve a különböző mikroorganizmusok jelenlétéből származó stressz-hatásoknak. Az ellenük való egyik hatékony növényi védekezési forma, az ún. általános védekezés (BR – *basal resistance*), amely nem jár látható tünetekkel, szemben pl. a látványos nekrotikus léziókat előidéző hiperszenzitív válasszal (HR – *hypersensitive response*). Hiperszenzitív választ csak az adott kórokozó (és csak *kórokozó!*) baktériumra nézve rezisztens növények képesek adni, míg a BR kiváltására patogén, szaprofita vagy akár hővel elölt baktérium is képes – eddigi irodalmi adatok alapján – bármilyen növényben.

Munkáink során megállapítottuk, hogy a dohánynövényekben baktérium segítségével kiváltott BR gátló hatással van egy későbbi dohány mozaik vírus fertőzés lefolyására mind a tünetek (HR nekrozisok), mind a vírus replikációja tekintetében.

A BR során megváltozott aktivitást mutató gének vizsgálatai során megállapítottuk, hogy olyan jelátviteli kulcsmolekulák, mint a foszfolipáz-A2 és a foszfolipáz-D a legtöbb általunk vizsgált BR-hez köthető gén aktivitását a fertőzést követő korai időpontokon túl (6-12 óra) már nem befolyásolják, míg a foszfolipáz-C-nek a későbbi, 24., 48. órai időpontokban (is) jut szerep.

Vizsgálati eredményeinket irodalmi adatokkal is egybevetve feltételezhetjük, hogy a jelátviteli útvonalak között szoros kapcsolat figyelhető meg. Így vélhetően szoros kapcsolat áll fenn a MAP-kináz kaskád és a foszfolipáz-A2 között. De szorosan kapcsolódhatnak egymáshoz a PLC útvonal elemei a fehérjelebontáshoz is. Az annexin-szerű fehérje expressziós szintjének különböző gátlószeres kezelésekre adott érzékeny reakciója szintén az útvonalak közti kapcsolatok meglétét sejteti. Mind a jelátviteli, mind pedig a fehérjelebontáshoz köthető enzimek génei között egyaránt

találtunk olyanokat, amelyek az általuk érintett BR folyamatokat adott időpontban vélhetően pozitívan, illetve negatívan szabályozzák. Ez a regulációs szerep akár időben változhat is.

Növényi aktív proteináz-szintet mérve megállapítottuk, hogy egy – feltételezett papain-szerű – cisztein-proteináz feldúsul a BR során a dohány leveleiben.

Proteináz-mutáns *Arabidopsis* növényekben mért baktériumszaporodás mértéke azt sugallja, hogy két szerin-proteináz (szubtiláz és karboxipeptidáz) fontos szerepet tölt be a BR során a baktériumok visszaszorításában.

A készen vásárolt *Arabidopsis*okkal szemben a dohánynövényekre adaptált *Agrobacterium* vektor konstrukció egy TMV szatellitvírus (STMV) felhasználásával adhat a jövőben hatékony átmeneti expressziós eszközt a kezünkbe.

Publikációk listája

IF-es folyóiratcikkek

Szabó E, Szatmári Á, Hunyadi-Gulyás É, Besenyei E, Zsiros LR, Bozsó Z, Ott PG. 2012. Changes in apoplast protein pattern suggest an early role of cell wall structure remodelling in flagellin-triggered basal immunity *Biologia Plantarum* 56:551-559 [IF: 1,974]

Bozsó Z, Maunoury N, Szatmári Á, Mergaert P, Ott PG, Zsiros LR, Szabó E, Kondorosi É, Klement Z. 2009. Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula* *Plant Molecular Biology* 70:627-646 [IF: 3,978]

Zsiros L, Szatmári Á, Palkovics L, Klement Z, Bozsó Z. 2007. Bacterium induced basal resistance inhibits viral infection in tobacco plants *Cereal Research Communications* 35(2):1345-1348 [IF: 1,19]

Nem IF-es folyóiratcikkek

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E, Varga GJ, Szatmári Á, Szabó E, Zsiros LR, Klement Z. 2009. Efficient transposon mutagenesis in a wide range of phytopathogenic Gram-negative bacteria *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 44(1):19-24

Konferenciakiadványok

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó Erika, Ott PG, Bozsó Z. 2008. A baktériumok által kiváltott általános védekezés és hatása más fertőzési mechanizmusú kórokozókra *Pro Scientia Aranyérmesek VIII. Konferenciája* 87-92

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Bozsó Z. 2008. Baktériumok indukálta általános védekezés (BR) jelátviteli folyamatai dohány levélben *54. Növényvédelmi tudományos napok. Összefoglaló* 33

Szabó E, Zsiros LR, Szatmári Á, Szamos J, Bozsó Z, Ott PG. 2008. Isolation and characterization of EBR specific induced chitinases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) *Acta Biologica Szegediensis* 52(1):251-252

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Bozsó Z. 2008. Plant protein degradation affects transcription of genes associated with bacterium-induced basal resistance *Acta Biologica Szegediensis* 52(1)253-255

Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Mergaert P, Kondorosi E, Zsiros L, Bozsó Z. 2007. Characterisation of proteins and novel types of peptides with putative antimicrobial activities in plant-microbe interactions *XIII. International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions Abstracts* 168

Nem a doktori értekezés témájában megjelent publikációk

Ködöböcz L, Zsiros LR, Murányi A. 2011. A szójaoltás hatása csernozjom talajon *Agrokémia és talajtan* 60(1):233-244

Ködöböcz L, Zsiros LR, Murányi A. 2008. Symbiotic effectiveness of inoculation on soybean plant (*Glycine max* L.) *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és XI. Fermentációs Kollokvium. Összefoglaló* 44-45

Irodalom

- Abramovitch RB., Janjusevic R., Stebbins CE., Martin GB.** 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of National Academy of Sciences* 8:2851-2856
- Baek KH, Choi D.** 2008. Roles of plant proteases in pathogen defense *The Plant Pathology Journal* 24(4):367-374
- Baker CJ, Mock N, Atkinson MM, Hutcheson S.** 1990. Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digest of cell wall and of polygalacturonic acid *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37:155-167
- Baker CJ, Orlandi EW.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321
- Beffa RS, Hofer R-M, Thomas M, Meins F Jr.** 1996. Decreased susceptibility to virus disease of β -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* 8:1001-1011
- Boller T., Felix G.** 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406
- Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Klement Z.** 1999. Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrmA* mutants to cause HR. *Physiological Molecular Plant Pathology* 55: 215-223
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball CA., Causton HC., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege FC., Kim IF., Markowitz V., Matese JC., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M.** 2001. Minimum information about microarray experiment (MIAME) – toward standards for microarray data. *Nature Genetics* 29(4):365-371
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P.** 2004. Rank Products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments, *FEBS Letters*, 573:83–92
- Brown IR, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP.** 1998. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose in papillae formed during the interactions between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal* 15: 333-343
- Burgyán J, Klement Z.** 1979. Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathologia Mediterranea* 18: 153-161
- Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu, T, Luan S.** 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-667
- Currier HB.** 1957. Callose substance in plant cells *American Journal of Botany* 44(6):478-488
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588
- Dong X.** 2005. Functional investigation of *Arabidopsis* callose synthases and the signal transduction pathway. *Doktori értekezés.* The Ohio State University, USA
- Fan J, Crooks C, Lamb C.** 2007. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens* luxCDABE. *Plant Journal* 53(2):393-399
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18: 256-276
- Gilchrist DG.** 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414
- Gosselé V., Fachel I., Meulewaeter F., Cornelissen M., Metzloff M.** 2002. SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants *The Plant Journal* 32: 859-866
- Grant M, Mansfield J.** 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 312-319
- Hafez YM.** 2005. Biochemical and molecular studies on the role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *PhD Thesis. Szent István Egyetem, Gödöllő*
- Hao L., Hsiang T., Goodwin PH.** 2006. Role of two cysteine proteinases in the susceptible response of *Nicotiana benthamiana* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Science* 170:1001-1009
- Hoshino T, Mizutani A, Chida M, Hidaka H, Mizutani J.** 1995. Plant annexin form homodimer during Ca^{2+} -dependent liposome aggregation *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(4):749-755
- Jaffe MJ, Huberman M, Johnson J, Telewski FW.** 1985. Thigmomorphogenesis: The induction of callose formation and ethylene evolution by mechanical perturbation in bean stems *Physiologia Plantarum* 64 (2):271-279
- Kim HS., Delaney TP.** 2002. *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic resistance. *The Plant Cell* 14:1469-1482
- Király Z, Barna B, Király L.** 2007. Plant resistance to pathogen infections: forms and mechanisms of innate and acquired resistance *Journal of Phytopathology* 155:385-396
- Klement Z.** 1982. Hypersensitivity. In: Mount MS, Lacy GH, eds. *Phytopathogenic Prokaryotes Vol. 2.* New York: Academic Press, 149-177.
- Klement Z.** 1990. Infiltration of plant tissues. In: Klement Z, Rudolph K, Sands DC, eds. *Methods in Phytobacteriology.* Budapest: Akadémiai Kiadó, 389

- Klement Z, Bozsó Z, Kecskés ML, Besenyei E, Czalleng A, Ott PG.** 2003. Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Management Science* 59: 465-474
- Klement Z, Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Rudolph K.** 1999. Symptomless resistant response instead of the hypersensitive reaction in tobacco leaves after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Phytopathology* 147: 467-475
- Mazzucchi U, Pupillo P.** 1976. Prevention of confluent hypersensitive necroses in tobacco leaves by a bacterial protein lipopolysaccharide complex. *Physiological Plant Pathology* 9: 101-112
- Newman M-A, Daniels MJ, Dow JW.** 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defence-related gene expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 778-780
- Novacky A, Hanchey P.** 1976. Effect of internal injury on bacterial hypersensitivity. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 11: 217-222
- Nürnberg T, Nennstiel J, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D.** 1994. High-affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-460
- Ott PG, Szabó L, Balázs E, Klement Z.** 1997. Submicroscopic evidence of bacterially induced resistance in tobacco leaves. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 32:265-280
- Parente L, Solito E.** 2004. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein *Inflammation Research* 53(4):125-132
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H.** 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence *Current Opinion in Plant Biology* 12:421-426
- Politis DJ, Goodman RN.** 1978. Localized cell wall appositions: Incompatibility response of tobacco leaf cells to *Pseudomonas pisi*. *Phytopathology* 68: 309-316
- Radford JE., Vesk M., Overall RL.** 1998. Callose deposition at plasmodesmata *Protoplasma* 201:30-37
- Ringli C, Keller B, Ryser U.** 2001. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1430-1441
- Roberts AG, Oparka KJ.** 2003. Plasmodesmata and the control of symplasmic transport. *Plant, Cell and Environment* 26: 103-124
- Robertson D.** 2004. VIGS Vectors for Gene Silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55:495-519
- Roossinck MJ, Sleat D, Palukaitis P.** 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56(2):265-279
- Scholthof KBG.** 2004. Tobacco Mosaic Virus: A model system for plant biology. *Annual Review of Phytopathology*. 42:13-34
- Szatómári Á.** 2008. A baktériumok által indukált általános rezisztenciával kapcsolatba hozható növényi gének azonosítása és kifejeződésük vizsgálata. *Doktori értekezés* Szent István Tudományegyetem
- Szatómári Á, Ott PG, Varga GJ, Besenyei E, Czalleng A, Klement Z, Bozsó Z.** 2006. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep* 25:728-740.
- Trewavas A.** 2000. Signal perception and transduction. In: *Buchanan B., Gruissem R., Jones R. eds – Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. 930-987
- van der Hoorn RA., Jones JD.** 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinions in Plant Biology* 7: 400-407.
- van der Hoorn RA.** 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms *Annual Review of Plant Biology* 59:191-223
- Vierstra RD.** 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many proteins *Trends in Plant Science* (8)3:135-142
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang M-B.** 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plant Science* 4: 452-457
- Wenlong L, Yongshan Z, Chunji L, Guibin Y, Sisi W, Chunyan H, Mengchen Z, Dongmei W.** 2012. Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of Soybean mosaic virus *Plant Cell Reports* 31(5):905-916
- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P.** 2006. Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana* *Acta Biochimica Polonica* 53(2): 289-298
- Xia Y., Suzuki H., Blount J., Guo Z., Patel K., Dixon RA., Lamb C.** 2004. An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal* 23:980-988
- Zhang H, Zheng X, Zhang Z.** 2010. The role of vacuolar processing enzymes in plant immunity *Plant Signaling and Behavior* 5(12):1565-1567
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-2632.

