

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



***Lactobacillus casei* által termelt xenobiotikumok
azonosítása és a kajszi önmeddőségének vizsgálata
metabolomikai ujjnyomatkészítés segítségével**

Lénárt József

doktori (Ph.D.) értekezése

Témavezetők:

Dr. Hegedűs Attila

Dr. Dernovics Mihály

Készült a Budapesti Corvinus Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszékén és
Alkalmazott Kémia Tanszékén

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. Hegedűs Attila
Egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Dr. Dernovics Mihály
Egyetemi docens, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

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 nyilvános vitára bocsátható.

.....
Dr. Hegedűs Attila

.....
Dr. Tóth Magdolna

.....
Dr. Dernovics Mihály

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács
2014. december 2-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi
Bíráló Bizottságot jelölte ki:**

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Tóth Magdolna, DSc

Tagjai

Woller Ágnes, PhD

Lelik László, CSc

Vékey Károly, DSc

Kiss Erzsébet, CSc

Opponensek

Bisztray György, PhD

Drahos László, PhD

Titkár

Woller Ágnes, PhD

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	IX
1. BEVEZETÉS.....	1
1.1 Metabolomika	1
1.1.1 Metabolomika besorolása, jelentősége	1
1.1.2 Élő és élettelen metabolomika	3
1.1.3 Metabolomika típusai	3
1.1.3.1 Metabolomikai profilvizsgálat	4
1.1.3.2 Metabolomikai ujjlenyomatkészítés.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1 Metabolomika	7
2.1.1 Metabolomikai vizsgálatok során alkalmazott analitikai módszerek	7
2.1.1.1 Tömegspektrometria.....	8
2.1.1.1.1 GC-MS kapcsolt rendszer.....	9
2.1.1.1.2 LC-MS kapcsolt rendszer	10
2.1.1.1.3 TOF és QTOF tömegspektrométerek jellemzői.....	13
2.1.2 Metabolomikai mintaelőkészítési lehetőségek	14
2.1.2.1 Homogenizálás.....	15
2.1.2.2 Metabolitok extrakciója	15
2.1.2.2.1 Szilárd-folyadék extrakció.....	16
2.1.2.2.2 Szilárd fázisú extrakció	16
2.1.3 Metabolomikai adatbányászat.....	17
2.1.4 Statisztikai kiértékelés	20
2.1.5 Komponensek azonosítása	22
2.2. Az emberi emésztőrendszer mikrobiomja	24
2.2.1 Tejsavbaktériumok, <i>Lactobacillus casei</i>	26
2.2.2 Az emberi bélrendszer és a xenobiotikumok.....	27
2.2.3 Peszticidek	28
2.2.4 A peszticidek, mint a xenobiotikumok jelentős forrása.....	29
2.2.4.1 Fenhexamid.....	30
2.3. Rosaceae családba tartozó gyümölcsfák önmeddőségének genetikai háttere.....	31
2.3.1 A gametofitikus önmeddőség pollen és bibe között lejátszódó reakciói.....	32
2.3.2 A pollen és bibe S-fehérjéi között lejátszódó molekuláris kölcsönhatások lehetséges modelljei.....	34
2.3.3 Az S-lókuszon kívüli molekuláris kölcsönhatások és jelátviteli folyamatok a <i>Rosaceae</i> családban öntermékenyülés és idegen megporzás esetén.....	35

2.3.4 Az önmeddőség mezőgazdasági jelentősége	38
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	41
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	43
4.1 Felhasznált vegyszerek	43
4.2 HPLC-ESI-QTOF MS kapcsolt rendszer	43
4.3 Adatfeldolgzás - Nem célzott komponenskeresés.....	45
4.4 <i>Lactobacillus casei</i> által termelt fenhexamid eredetű klór-tartalmú xenobiotikumok metabolomikai feltérképezése	46
4.4.1 Sejttenyészetek elkészítése	46
4.4.2 Mintaelőkészítés	47
4.4.3 HPLC paraméterek.....	48
4.4.4 Differenciáló komponensek meghatározása	48
4.4.5 Komponensazonosítás.....	49
4.5 Kajszi önmeddőségének metabolomikai ujjlenyomat készítése	50
4.5.1 Növényi minták gyűjtése	50
4.5.2 Minta-előkészítés	51
4.5.3 HPLC paraméterek.....	51
4.5.4 Differenciáló komponensek meghatározása	52
4.5.5 Komponensazonosítás.....	53
5. EREDMÉNYEK	55
5.1 Fenhexamid eredetű xenobiotikumok keresése <i>Lactobacillus casei</i> tenyészetekben	55
5.1.1 <i>Lactobacillus casei</i> tenyészetek	55
5.1.2 HPLC-ESI-MS paraméterek	56
5.1.3 Adatbányászat	58
5.1.3.1 Nem célzott komponenskereső algoritmus validálása	58
5.1.3.2 Klór-tartalmú metabolitok keresése	61
5.1.3.3 Végleges, klór-tartalmú komponensek felismerésére szolgáló algoritmus	62
5.1.4 Komponenskeresés SPE dúsítás nélkül	63
5.1.5 Komponenskeresés SPE dúsítás után.....	64
5.1.6 Komponensazonosítás.....	69
5.2 A kajszi önmeddőségi reakcióinak vizsgálata metabolomikai ujjlenyomat készítéssel.....	72
5.2.1 Metabolomikai ujjlenyomat készítés, növényi metabolitok keresése	72
5.2.2 Differenciáló komponensek meghatározása	73
5.2.3 Differenciáló komponensek azonosítása.....	77
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	87

7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	89
7.1 <i>Lactobacillus casei</i> által termelt fenhexamid eredetű klór-tartalmú xenobiotikumok metabolomikai feltérképezése.....	89
7.2 A kajszai önmeddőségének vizsgálata metabolomikai ujjlenyomatkészítéssel	89
8. SUMMARY	91
8.1 Metabolomic investigation of xenobiotics of fenhexamid origin produced by <i>Lactobacillus casei</i>	91
8.2 Metabolomic fingerprinting of self-incompatibility reactions in apricots.....	91
9. IRODALOMJEGYZÉK	93
10. MELLÉKLETEK	103
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol jelentés	Magyar jelentés
ACN	acetonitrile	acetonitril
ADI	acceptable daily intake	elfogadható napi bevitel
ANOVA	analysis of variance	variancia analízis
API	atmospheric pressure ionization	atmoszférikus nyomású ionizáció
APPI	atmospheric pressure photo ionization	atmoszférikus nyomású fotoionizáció
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
ARfD	acute reference dose	akut referenciadózis
BHT	butylated hydroxytoluene	butil-hidroxi toluol
BPC	base peak chromatogram	főcsúcs kromatogram
CE	capillary electrophoresis	kapilláris elektroforézis
CID	collisionally induced dissociation	ütközésindukált fragmentáció
DDA	data dependent analysis	adatfüggő analízis
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxi-ribonukleinsav
EFSA	European Food Safety Authority	Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság
EI	electron ionization	elektron ionizáció
EIC	extracted ion chromatogram	extrahált ion kromatogram
ESI	electrospray ionization	elektroporlasztásos ionizáció
ETD	electron transfer dissociation	elektrontranszfer disszociáció
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmészügyi és Mezőgazdasági Szervezete
FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance	Fourier-transzformációs ionciklotron rezonancia analizátor
FWHM	full width at half maxima	félértékszélesség
GC	gas chromatography	gázkromatográfia
GSI	gametophytic self incompatibility	gametofitikus önmeddőség
HCA	hierarchical cluster analysis	hierarchikus klaszteranalízis
HCD	high energy collision dissociation	nagyenergiájú ütköztetési fragmentáció
HILIC	hydrophilic interaction chromatography	hidrofil kölcsönhatás kromatográfia

HPLC	high performance liquid chromatography	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IDA	information dependent analysis	információfüggő analízis
IT	ion trap	ioncsapda
k'	capacity factor	kapacitás faktor
LC	liquid chromatography	folyadékkromatográfia
LIT	linear iontrap	lineáris ioncsapda analizátor
MFE	molecular feature extraction	-
MFG	molecular formula generator	összegképlet generátor
MIP	molecularly imprinted polymers	molekuláris lenyomatú polimerek
MLPK	membrane linked cytoplasmic serine/threonine protein kinaze	membránhoz kötött citoplazmatikus szerin/treonin protein-kináz
TOF	time-of-flight	repülési idő
MPP	MassProfiler Professional	-
MRL	maximum residue limit	maximális szermaradék határérték
mRNS	messenger RNA	hírvivő RNS
MS	mass spectrometry	tömegspektrometria
MS/MS (MS ²)	tandem mass spectrometry	tandem tömegspektrometria
N	number of theoretical plates	elméleti tányérszám
NCAIM	National Collection of Agricultural Mikroorganizmusok and Industrial Microorganisms	Mezőgazdasági és Ipari Nemzeti Gyűjteménye
NMR	nuclear magnetic resonance	magmágneses rezonancia
PCA	principal component analysis	főkomponens analízis
PCD	programmed cell death	programozott sejthalál
PLS-DA alapuló	partial least squares discriminance analysis	részleges legkisebb négyzetek elvén diszkriminancia analízis
PP	pollen protein	pollenfehérje
ppb	parts per billion	milliárdod rész (10 ⁻⁹)
ppm	parts per million	milliomod rész (10 ⁻⁶)
PTFE	polytetrafluoroethylene	politetrafluoroetilén (teflon)
QTOF	quadrupole time-of-flight	kvadrupol-repülési idő analizátor
RAM	restricted access material	korlátozott elérésű anyagok
RDBE	ring and double-bond equivalent	telítetlenségi egyenérték
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
R _s	resolution	felbontás

SC	self-compatibility	öntermékenység
SI	self-incompatibility	önmeddőség
SFB	S-haplotype specific F-box	S-haplotípus specifikus F-box
S/N	signal-to-noise ratio	jel/zaj arány
SPE	solid-phase extraction	szilárd fázisú extrakció
S-RN-áz	S-ribonuclease	S-ribonukleáz
T	tailing factor	tailing faktor
TFA	trifluoroacetic acid	trifluor-ecetsav
TIC	total ion chromatogram	teljes ion kromatogram
TLC	thin layer chromatography	vékonyréteg kromatográfia
t_R	retention time	retenciós idő
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography	ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia

1. BEVEZETÉS

1.1 Metabolomika

A metabolomika a kis, jellemzően 1,5 - 2 kDa alatti molekulatömegű elsődleges- illetve másodlagos anyagcseretermékek vizsgálatával foglalkozó tudományág, mely napjainkban egyre népszerűbb és ennek köszönhetően rohamosan fejlődik. A metabolomika céljai többek között a metabolitok azonosítása, ezáltal anyagcsere útvonalak felfedezése, biomarkerek keresése, biokémiai folyamatok megismerése és anyagcseretermékek fluxusának megfigyelése szerepel.

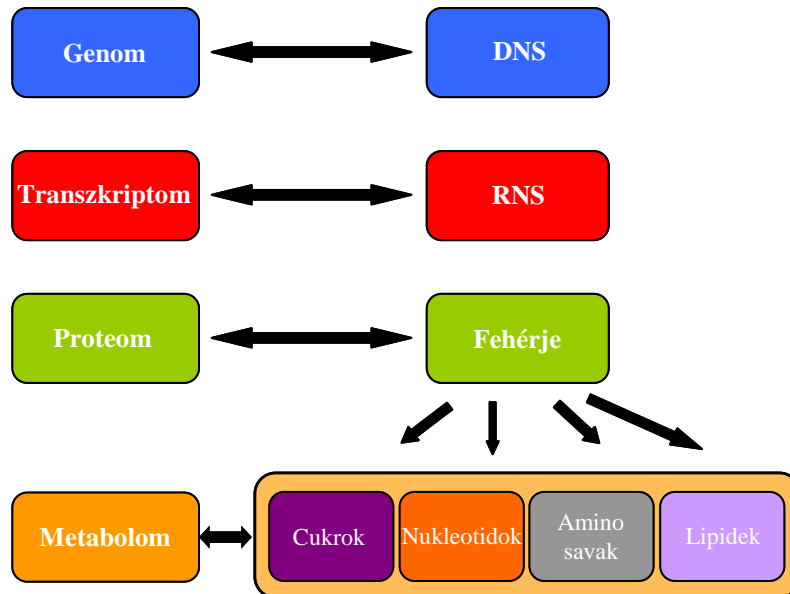
E tudományág alapvető tulajdonsága, hogy egyszerre nagy komponensszámmal dolgozik és törekszik egy adott szerkezetet teljes vagy lokális szinten komponensek, anyagcseretermékek minél szélesebb körének figyelembevételével jellemezni. Az egy szervezetben jelen lévő metabolitok összessége alkotja az úgynevezett metabolomot. A metabolom tekinthető egy bizonyos molekuláris ujjlenyomatnak is, mely dinamikusan reagál az adott szerkezetet érő hatásokra, külső környezetből érkező stresszre, bizonyos kezelésekre stb. Ezáltal valamilyen jól meghatározott külső kezelésnek kitett, (pl. betegség által megbetegített minta) csoport és egy kontroll, azaz kezelés- és betegségmentes minta csoport metabolomjának összehasonlítása nagy információ tartalommal bír. A két csoport összevetése által pedig a differenciáló, azaz a különbséget okozó komponensek megfelelő kísérlettervezéssel és kemometriai módszerek segítségével kiszűrhetők és azonosíthatók, ami által közelebb kerülhetünk egy adott mechanizmus megértéséhez.

1.1.1 Metabolomika besorolása, jelentősége

Biológiai környezetben a metabolom egészét nem lehet teljes mértékben átfogó módon jellemezni, illetve az összes jelen lévő metabolitot detektálni és azonosítani, de ez nem is minden esetben cél. A teljes mértékben átfogó molekuláris kép létrehozása leginkább mérés-technikai oldalról nem lehetséges, hiszen a rendelkezésre álló technikák bizonyos szinten specifikusak, úgymint pl. a hidrofób, hidrofil, ionos, illékony stb. molekulák körére. A metabolomika viszont ennek ellenére mindenképp rendkívül hasznos, hiszen új információkkal járul hozzá a komplex biológiai rendszerek és azok anyagcsere útvonalai működésének megértéséhez a genomika, transzkriptomika és proteomika kiegészítésével (**1. ábra**).

A genetikában ismert centrális dogma kimondja, hogy a genetikai információ áramlása, ezzel együtt a fenotípus végső formájához vezető út egyirányú, melynek módja, hogy a DNS-ben tárolt információ a transzkripció során messenger RNS-ekre (mRNS) íródik át, majd a transláció során az mRNS-ekben tárolt információ alapján történik a fehérjék bioszintézise a riboszómáknak köszönhetően, ezáltal az információ fehérje szintre fordítódik át. Ebből következik, hogy a genetikai információ fehérjék szintjéig jól követhető, hiszen az RNS-ek

összesen négy lehetséges összetevője (purin és pirimidin vázas bázisok), illetve a fehérjéket felépítő 22 esszenciális aminosav ismert, ezeknek „csupán” a szekvenciája változik. Természetesen azonban a proteomikában és genetikában is bőven akadnak feltáratlan folyamatok.



1. ábra: A metabolomika elhelyezkedése.

Ettől eltérően „sajnos” a végső fenotípus kialakításában szerepet játszó anyagcseretermékeket felépítő atomok, illetve kémiai csoportok száma nagyságrendekkel nagyobb, szerkezetük, felépítésük rendkívül szerteágazó. A génekhez és fehérjékhez hasonló szekvenálásuk tehát nem lehetséges, ehelyett azonosításuk érdekében elemi összetételüket, a felépítő atomok kötődését és sztereokémiai viszonyokat is *de novo* kell meghatározni, melynek módja meglehetősen összetett (Fiehn, 2002).

Míg a genomika, transzkriptomika és proteomika nagyot lépett előre technológiai fejlődés terén, a metabolom átfogó vizsgálatához szükséges eszközök még mindig váratnak magukra (Bino és mtsai., 2004). Bár az „omika” tudományágak végpontja a metabolomika, és ez áll legközelebb a fenotípusok jellemzéséhez, nincs olyan „egyműszeres” eljárás, amely az összes metabolit meghatározására alkalmas lenne. Lehet, hogy pont ez az oka a metabolomika lemaradásának a többi „omika” tudományághoz képest, amelyek egy műszeren vagy műszeregyüttesen történő megvalósítása már megoldódott.

A metabolomikával foglalkozó publikációk száma, illetve számuk növekedése jól jelzi a terület növekvő relevanciáját. Az emelkedő számok alapján bebizonyosodik, hogy a metabolomika ténylegesen használható eszköz a fenotípusok és a biológiai szervezeteket ért külső hatások által indukált változások tanulmányozására, legyen szó növények, állatok, mikroorganizmusok, humán vagy környezeti minták metabolomikai vizsgálatáról.

A metabolom „átfogó” vizsgálata meglehetősen bonyolult és összetett: számos, különböző típusú molekula alkotja, úgymint pl. aminosavak, peptidek, cukrok, lipidek, szerves savak, nukleotidok stb. E metabolitok eloszlása pedig mind időben, mind pedig térben változik.

Ezt ráadásul tetézi az is, hogy minden egyes szervezet metabolomja egyedi, hatalmas biológiai diverzitást okozva ezzel, mely például emlősöknél következhet az eltérő étrendből, növényeknél az eltérő fényviszonyokból és számtalan egyéb eltérésekből (Vigneau-Callahan és mtsai., 2001). Emiatt rendkívül nagy jelentőségű a gondos kísérlettervezés, pl. több biológiai párhuzamos minták vizsgálata, több időpontban történő mintavétel, illetve minták releváns részeinek kiválasztása és előkészítése.

1.1.2 Élő és élettelen metabolomika

Élő minták esetén alapvető probléma, hogy az élő szervezetek dinamikusan változnak a külső környezet hatásainak megfelelően. Bármilyen külső hatásra adott reakció befolyásolja a metabolom összetételét, tehát alapvetően fontos, hogy azonos körülményeknek tegyünk ki a vizsgálni és összehasonlítani kívánt szervezeteket, hogy a különbségtétel során kizárólag az általunk alkalmazott megkülönböztetés szerinti eltérést észlelhessük és a metabolomot más hatás ne befolyásolja, mert az hibás következtetések levonását eredményezheti.

Élettelen minták esetén ilyen dinamikus változásokra nem kell számítani, ott a gondot a minták stabilitása, illetve a minták előkészítése során fellépő hatások, pl. oxidáció, bomlási (decomposition) folyamatok jelentik, melyek ellen védekezni kell. A minták feldolgozása és a minták állapota, a kezelések nyomon követése ugyanakkor sokkal egyszerűbb, mint élő szervezetek esetében.

1.1.3 Metabolomika típusai

A különböző komponensek nagy diverzitást mutatnak fizikai és kémiai tulajdonságaikban, valamint koncentrációjukban. Előfordulnak mind makrokomponensek (százalékos nagyságrend), mind pedig nyomnyi koncentrációjú ($\mu\text{g/ml}$, ng/ml és stb.) komponensek is. A metabolitok pontos számát pedig nem lehet megmondani, csupán becsülni lehet annak nagyságrendjét. A szerteágazóságból és összetettségéből következően nagy kihívást jelent a metabolomika analitikai szempontból, illetve az „összes” metabolit egyszerre történő mennyiségi meghatározására és azonosítására továbbra sem áll rendelkezésre megfelelő analitikai mérés technika.

Jelenleg az eltérő célok miatt két különböző csoportba sorolhatjuk a metabolomikai vizsgálatokat: metabolomikai profilvizsgálat (metabolic profiling) és metabolomikai ujjlenyomat készítés (metabolic fingerprinting) (Dettmer és Hammock, 2004).

1.1.3.1 Metabolomikai profilvizsgálat

A metabolomikai profilvizsgálat kizárólag metabolitok egy csoportjára fókuszál, amelyek egy bizonyos anyagcsere útvonal résztvevői, azonos komponens csoportba tartoznak, vagy bizonyos közös tulajdonságon osztoznak. Kiváló példa erre az élesztőgombák, pl. *Pichia pastoris* aminosav és szerves sav profiljának monitorozása (Klavins és mtsai., 2013), vagy egyéb lipidomikai profilvizsgálatok (Qi és mtsai., 2014). E módszer előzetes információkra épít és sokkal inkább egy hipotézis vezérli, mintsem egy hipotézis kialakítása a cél. Egy még célirányúbb típusa ennek a célzott keresés (target analysis), ahol előzetesen kiválasztott, azaz ismert célkomponenseket határoznak meg, melyek jellemzően valamilyen biomarkerek, toxikus komponensek, szubsztrátok, vagy enzimes reakciók termékei stb. (Fiehn, 2002).

Az analitok, metabolitok jellegének és tulajdonságainak megfelelően azok meghatározására számos analitikai megoldás kínálkozik. Az utóbbi néhány évben továbbfejlesztett rengeteg méréstechnikai eljárásnak köszönhetően egyre több és több célmolekula határozható meg szimultán módon, egyetlen mérés során. A mérési paraméterek továbbá optimálhatók a célkomponensekre, valamint a komponensek mennyiségileg meghatározhatók, hiszen ezek nagy részében standard vegyületek is rendelkezésre állnak. Ezek ellenére azonban a metabolomikai profilvizsgálatok technikai megvalósítás szempontjából nem feltétlenül egyszerűbbek, mint a metabolomikai ujjlenyomat készítés, hiszen a keresett komponensek ugyancsak komplex mátrixban lehetnek jelen, és az ezekre való optimálás, megfelelő szelektivitás és érzékenység elérése, valamint megbízható mennyiségi meghatározásuk módjának létrehozása is analitikai kihívást jelent. Bár különböző metabolitokról számos információ áll rendelkezésre az irodalomban, a globális adathalmazokba való beépítésük módja még nincs teljesen megoldva. A metabolomikai profilvizsgálat legfőbb korlátja azonban, hogy esetében nem beszélhetünk átfogó, igazi „omikai” eljárásról. Ennek ellenére az így nyert kvantitatív információk is nagy mértékben hozzájárulhatnak adatbázisok létrehozásához, ezáltal pedig a metabolomikai útvonalak és biológiai rendszerek még alaposabb megértéséhez.

1.1.3.2 Metabolomikai ujjlenyomatkészítés

E módszer célja nem az összes jelen lévő metabolit azonosítása, hanem azon differenciáló, azaz megkülönböztető komponensek meghatározása és kiszűrése, amelyek egy bizonyos kezelés vagy külső hatásból következően eltérő mértékben vannak jelen a két különböző mintában/mintacsoportban. A metabolitok kompozíciója egyfajta „ujjlenyomat”, mely dinamikusan változik pl. jól definiált betegség, állapot, mérgezés, környezeti vagy genetikai elváltozás hatására. Ennek a hatásnak jól definiálnak kell lennie és a kísérlettervezésnél gondot

kell fordítani arra, hogy egyetlen ismert hatás szerint különüljenek el a minták - ez különösen *in-vivo* biológiai minták esetén igényel nagy körültekintést és jelent nagy problémát.

A metabolomikai ujjlenyomatkészítés egyre inkább érdekes sok tudományág, pl. humán-, állat-, mikro- és növénybiológia, környezettudomány stb. számára, hiszen a végső fenotípus kialakulásának közelebbi megértését szolgálja. Sejttenyészetek esetében további lehetőség az intracelluláris, illetve extracelluláris metabolitok és a közegből felvett tápanyagok külön vizsgálata, mely a fenotípusra és fiziológiai állapotra vonatkozóan szolgálhat információval.

Mikrobák metabolomikai ujjlenyomatának vizsgálatát metabolomikai lábnyom készítésnek is hívják (Allen és mtsai., 2003). A metabolomikai ujjlenyomat vizsgálat ténylegesen beillik az „omikai” tudományágak közé, mivel anyagcseretermékek széles skáláját vizsgálja egyszerre, szimultán módon. A metabolomikai ujjlenyomat készítés többféle célra alkalmazható. Diagnosztikai esetekben az elsődleges cél, hogy a minták alapján a vizsgált szervezeteket meg tudják különböztetni, csoportokba tudják őket sorolni. Erre kiváló példa a klinikai esetek monitorozása, ahol metabolomikai ujjlenyomatkészítés segítségével időben is követni tudják a kezelt szervezet állapotát. Ha nincsen egyértelmű jele gyógyulásnak, e módszer segítségével eldönthető, újra egészséges lett-e a korábbi beteg egyed, vagy beteg maradt, ezáltal értékelhető a kezelés hatékonysága. E megközelítés nem segít közelebb kerülni a metabolomikai útvonalak megértésében, itt a hangsúly a klaszterezésen van, statisztikai alapon csoportok alkothatók, illetve a későbbiekben a minták csoportba sorolhatók. A komponensek azonosítása, sőt mennyiségi meghatározása sem minden esetben szükséges (Bowers és mtsai., 2014).

A metabolomika hatékonysága viszont akkor használható ki leginkább, ha kvalitatív és kvantitatív információt is egyaránt szolgáltat. A különböző fenotípusokra jellemző differenciáló komponensek segítségével a biokémiai útvonalak megérthetők, illetve közelebbről megismerhetők.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Metabolomika

2.1.1 Metabolomikai vizsgálatok során alkalmazott analitikai módszerek

A metabolomikai vizsgálatok során a különböző vizsgált minták sokszor komplex, összetett mátrixot jelentenek, a mátrixok többségében pedig még meglehetősen nagy a metabolomot alkotó komponensek száma. Ezt ráadásul az is tetézi, hogy a kezelések, hatások által okozott változások számos metabolitot befolyásolnak, ezáltal válik alapvetően szükségessé komponensek sokaságának egyidejű kvalitatív és kvantitatív (de legalább úgynevezett fél-quantitatív) meghatározására alkalmas analitikai módszerek alkalmazása. A mai napig nem áll rendelkezésre olyan mérés technika, melynek egyedüli alkalmazása átfogó képet adna a metabolomról, viszont kombinált használatuk által, egymást kiegészítve, a metabolom számottevő része lefedhető. A tömegspektrometria (MS) és a magmágneses rezonancia (NMR) technikák teszik ki a felhasznált mérés technikák messze túlnyomó részét, nagy teljesítményűeknek, sokoldalú alkalmazhatóságuknak és az utóbbi években elért nagymértékű fejlődésüknek köszönhetően. E módszerek főbb előnyeit és hátrányait foglaltam össze az **1. táblázatban**.

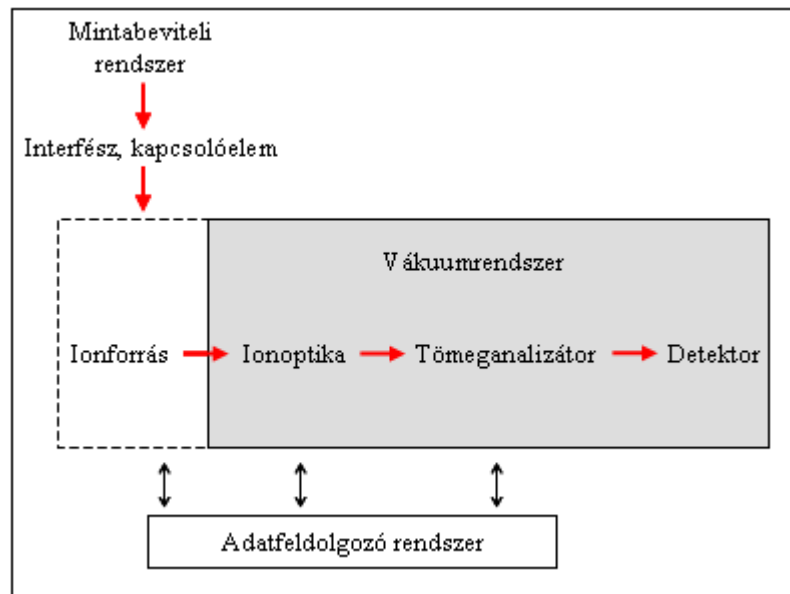
Az NMR és MS technikák nem helyettesíthetik egymást, azonban együttes alkalmazásukkal jól kiegészítik egymás tulajdonságait. A szakmai irodalomban találunk példát NMR és LC-MS (Lin és mtsai., 2008), NMR és GC-MS (Chan és mtsai., 2009), GC-MS és LC-MS (Johnson és mtsai., 2011; Kajander és mtsai., 2009; Scherling és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2010), NMR, LC-MS és GC-MS (Geier és mtsai., 2011; Psychogios és mtsai., 2011; Zulyniak és Mutch, 2011), GC-MS, LC-MS és CE-MS (Gao és mtsai., 2008) együttes alkalmazására. Disszertációmban az NMR és MS közül az utóbbit mutatom be részletesebben, mert saját munkám során is ezt alkalmaztam.

1. táblázat: A tömegspektrometria és magmágneses rezonancia összehasonlítása metabolomikai vizsgálatokban.

Tulajdonságok	Tömegspektrometria		NMR
	LC-MS	GC-MS	
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> - sokoldalú alkalmazhatóság, komponensek túlnyomó része vizsgálható - kiváló érzékenység - növekvő metabolit adatbázisok - fejlődő kromatográfiás felbontás 	<ul style="list-style-type: none"> - kiváló elválasztás - egyszerű, akár automatizálható komponensazonosítás, nagy adatbázisbeli lefedettség - kiválóan reprodukálható ionizáció és fragmentáció 	<ul style="list-style-type: none"> - egyértelmű komponens azonosítás - alacsony fajlagos költség nagy mintaszám esetén - jó reprodukálhatóság
Hátrányok	<ul style="list-style-type: none"> - gyártótól, műszertől függő ionizáció, rossz adatbázis lefedettség 	<ul style="list-style-type: none"> - csak illékony vagy illékonyá tehető molekulák esetén alkalmazható 	<ul style="list-style-type: none"> - rossz érzékenység - komponensek szimultán meghatározására nem képes, csak nagy tisztaságú komponensek meghatározására

2.1.1.1 Tömegspektrometria

Az első tömegspektrométert Thompson építette 1912-ben, amely módszert eredetileg hadiipari célokra szánták, viszont később önálló mérés technikává nőtte ki magát. A tömegspektrométerek alapvető tulajdonsága, hogy töltéssel rendelkező részecskék, azaz ionok létrehozását követően válnak alkalmassá azok meghatározására. A **2. ábrán** látható a tömegspektrométerek felépítése, amely szerint az első alkotóeleme az ionforrás, amit a tömeganalizátor, detektor és az adatfeldolgozó rendszer követ.



2. **ábra:** Tömegspektrométerek általános felépítése (forrás:

<http://ttk.pte.hu/analitika/letoltések/jegyzet/ch09s02.html>).

Az analitok (atomok vagy molekulák) először az ionforrásba jutnak, ahol a képződött ionok gázfázisba kerülnek (vagy eleve gázfázisban ionizálódnak, pl. EI, APPI és APCI) és tovább haladnak a tömeganalizátor irányába. A tömeganalizátor m/z értékük (tömeg/töltés arányuk) szerint megkülönbözteti, a detektor pedig detektálja az oda jutott ionokat. A tömegspektrométerek tömegérzékeny detektorok, mely szerint a detektált ionok mennyiségével arányos a kapott jel nagysága, ami miatt fél-quantitatív és kvantitatív mérésekre alkalmasak. A tömegspektrum az m/z értékekhez tartozó jelintenzitásokból tevődik össze: a jelintenzitás a komponens mennyiségével, illetve sok esetben (koncentrációérzékeny ionizáció, pl. ESI) relatív koncentrációjukkal van arányban.

Metabolomikai alkalmazások során a megfelelő szelektivitás és a detektálható molekulák nagy számának elérése érdekében az ionizációt megelőzően számos esetben szükséges az analitok szétválasztása. Így az azonosításhoz szükséges további tényezőt kapunk, a retencióidőt. Ilyen kromatográfiai rendszerek pl. gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (LC), kapilláris elektroforézis (CE), vékonyréteg kromatográfia (TLC) stb., ritkább esetekben azonban a minták elválasztása nem feltétlenül szükséges, közvetlenül a tömegspektrométerbe juttatható a minta (Koch és mtsai., 2014; Marshall és mtsai., 2014). Metabolomikai alkalmazásokban a gázkromatográfiahoz (GC-MS), illetve folyadékkromatográfiahoz (LC-MS) való kapcsolások a leggyakoribbak, nagy kromatográfiai felbontásuk és széleskörű alkalmazhatóságuk miatt.

2.1.1.1.1 GC-MS kapcsolt rendszer

A gázkromatográfia illékony és származékképzés során illékonyra tehető molekulák elválasztására alkalmas. Metabolomikai alkalmazások esetében az állófázisok jellemzően 0,25-

0,32 mm belső átmérőjű, belső felületén filmréteggel bevont kapilláris oszlopok, amelyek hossza 15-től akár 100 méterig terjedhet. A gázkromatográfiás elválasztásokra a rendkívül nagy elválasztási képesség jellemző, melyek nagy kromatográfiás felbontóképességet eredményeznek. GC-MS csatolások esetében az elektron ionizáció (EI) és kémiai ionizáció (CI) a legelterjedtebb ionizációs technika. Az EI erős ionizációs technika, amely azt jelenti, hogy nem csak ionizáció, hanem vele egy időben az anyaiionok fragmentációja is jelentkezik, tehát a tömegspektrumban a komponenssel együtt annak fragmentumai is megjelennek. Az EI nagy előnye, hogy az ionizáció során általánosan 70 eV-os energiát alkalmaznak, illetve a tömegspektrométerek kialakítása is egységes, amelyek együttesen azt eredményezik, hogy a kapott tömegspektrumok egységesek, a GC-s elválasztás típusától, készülék gyártótól stb. függetlenül. A spektrumok informatív jellegének, illetve egységességének valamint a GC-MS adatbázisokban található nagyszámú komponenseknek köszönhetően pedig a metabolitok többnyire egyértelműen azonosíthatók.

A GC-MS technika legfőbb korlátja azonban, hogy az instabil, hőérzékeny, illetve nagy molekulatömegű molekulákat nem lehet GC alapú technikákkal vizsgálni, mert nem illékonyak vagy nem tehetők azzá. Biológiai rendszerekben azonban éppen ez utóbbi komponensek a számottevők, tehát biológiai minták GC-MS alapú metabolomikai vizsgálata meglehetősen limitált. Munkámban folyadékkromatográfiához csatolt tömegspektrometria alapú (LC-MS) metabolomikai kísérleteket folytattam, ezért disszertációmban a továbbiakban az LC-MS technikákat részletezem.

2.1.1.1.2 LC-MS kapcsolt rendszer

A metabolomot alkotó kis molekulatömegű metabolitok kvalitatív, illetve kvantitatív vizsgálatára kiválóan alkalmas a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), épp ezért a HPLC-MS kapcsolt rendszer az egyik leggyakrabban alkalmazott mérés technika.

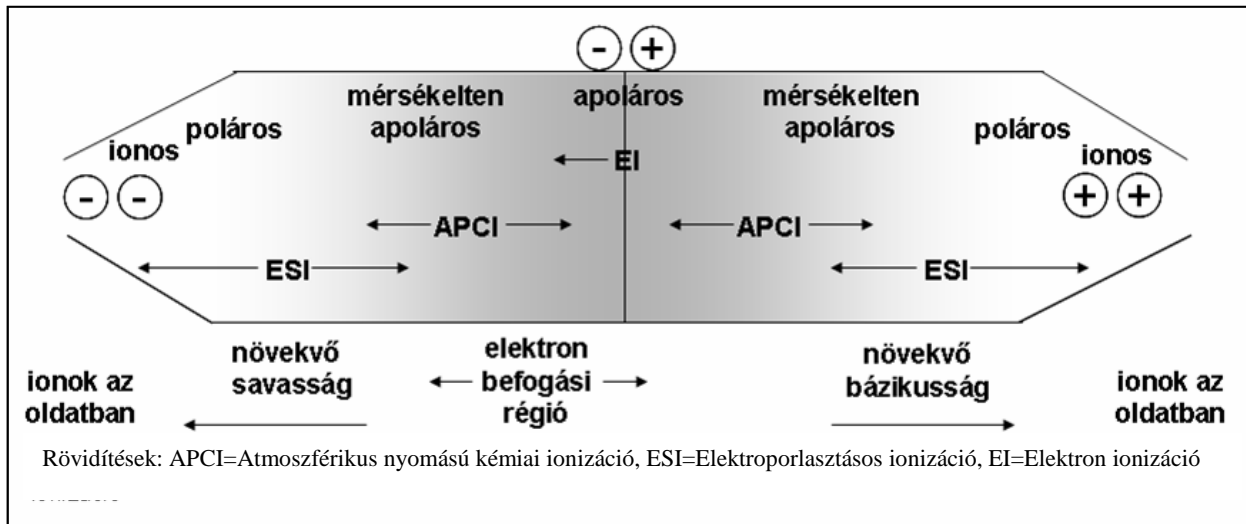
A HPLC többnyire származékképzés nélkül képes a mintában lévő komponensek elválasztására és számos típusú állófázis áll rendelkezésre (pl. fordított-, normál fázisú, ioncserés, hidrofil kölcsönhatás kromatográfia (HILIC) stb.), amely következtében számos különböző karakterű komponens egyidejű elválasztására alkalmas. A különböző állófázisok kombinálása által azok rendkívül jól kiegészíthetők egymást, mint például a fordított fázisú (közepesen poláris és apoláris komponensekre) és HILIC (poláris komponensekre) oszlopok is, amelyek használhatók párhuzamos és ortogonális (LC x LC) kapcsolásban is. Ortogonális kapcsoláson az eltérő mechanizmus alapján történő elválasztási technikák együttes alkalmazását értjük (pl. fordított fázis x ioncsere). E technikák együttes alkalmazása elegendő lehet a metabolom nagy részének lefedéséhez. Sheridan és mtsi (2012) számos különböző elválasztás összehasonlítása eredményeként arra jutottak, hogy fordított fázisú C18-as oszlopok 0,1 %-os (v/v) hangyasav tartalmú víz és acetonitril eluenssel eredményezi a komponensek

legszélesebb körének elválasztását. Különböző fajtájú kajszai gyümölcsök elsődleges, illetve másodlagos anyagcseretermékeinek összehasonlítása során alkalmazott fordított fázisú elválasztásra találunk példát Schmitzer és mtsai tanulmányában is (Schmitzer és mtsai., 2011). Ren és mtsai *L. japonica* virágaiban található 32 bioaktív komponens szimultán elválasztását, azonosítását és mennyiségi meghatározását hajtották végre HPLC-ESI-TOF MS kapcsolt rendszer segítségével (Ren és mtsai., 2008).

A HPLC technika az utóbbi években nagy fejlődésen ment keresztül és egyre gyakoribb a „normal bore” oszlopok (3,0 - 4,6 mm belső átmérő, 3-5 µm-es szemcseméret) helyett a kisebb oszlopok (1,0 - 2,1 mm belső átmérő, 2-3 µm-es szemcseméret) alkalmazása, ami pedig a kromatográfiás felbontás és ezzel együtt az egyszerre szimultán módon meghatározható komponensek számának növekedését eredményezi. A kapilláris oszlopok a nano oszlopokkal ellentétben valódi minták esetén is jól alkalmazhatók, alkalmazásuk nem annyira körülményes, reprodukálható és nem hajlamosak az eltömődésre.

A ma elérhető legnagyobb felbontás az ultra nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) rendszerekkel lehetséges, mely rendszerekben tipikusan porózus tölteteket használnak, ahol a szemcseméret 2 µm alatti és az oszlopok belső átmérője 2,1 mm. Az UHPLC rendszerek legfőbb előnyei a konvencionális HPLC-khez képest a futtatási idők lerövidülése és a megnövekedett kromatográfiás felbontás.

Mint említettem, metabolomikai vizsgálatok során az egyik leggyakrabban használt analitikai technika az LC-MS kapcsolt rendszer. Az „LC”, „MS” és „metabol*” keresőszavakra adott, 2000 óta megjelent kísérleti publikációk száma a Scopus tudományos irodalmi keresőben megközelíti a 12 ezret (2014. augusztus). LC-MS csatolások esetén az atmoszférikus nyomású technikák (API), mint az elektroporlasztásos ionizáció (ESI), atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (APPI) jellemzőek. Ezen ionforrások közül legszélesebb körben az ESI ionforrások terjedtek el, melyek lágy ionizálási képessége terjed ki a legtöbb komponensre, az erősen polárosoktól a közepesen apolárosokig (**3. ábra**) (Awad és mtsai., 2015).



3. ábra: Ionizációs folytonossági diagram (Thurman és mtsai., 2001).

Az ESI, mint lágy ionforrás ionizációs kapacitása (részben az adott feszültségen létrehozható ionáram korlátozottsága miatt) megoszlik az egyszerre eluálódó komponensek között, emiatt az ionizáció koncentrációfüggő. A HPLC-ből érkező térfogatáram ideális esetben 100 $\mu\text{l}/\text{perc}$ -es, illetve ez alatti, ilyenkor ugyanis a kapott jel és a koncentráció közötti összefüggés szélesebb tartományban lineáris (lineáris dinamikus tartomány). Ez persze nem minden esetben megoldott, de megfelelő mértékű hígítással ellensúlyozható. Emellett azért is kell ügyelni a minták megfelelő hígítására, mert a túl tömény minta mátrixa is túl intenzív lehet, ami a célkomponensektől veheti el az ionizáció lehetőségét. Nem célzott metabolomikai kísérleteknél is épp úgy gondot jelent az ionsuppresszió, ahol nincsenek célkomponensek, mert az együtt eluálódó komponensek „versengenek” az ionizációért, így a minták túlzott töménysége miatt nem minden komponens tud ionizálódni, ami információvesztéshez vezet.

Az LC-MS egyik legfőbb előnye, hogy egy futtatásban több ezer metabolit detektálására alkalmas, köszönhetően a HPLC oszlopok sokoldalúságának, egyre növekvő kromatográfiai felbontásának, az ESI ionforrás széleskörű alkalmazhatóságának, valamint a modern tömegspektrométerek kiváló érzékenységének és szelektivitásának. Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy az LC-MS rendszerek a korábban ezen a területen elterjedten használt GC-MS rendszerekhez képest jelenleg még jelentős hátrányban vannak abból a szempontból, hogy az ESI ionforrások kialakításának szerteágazósága és az ionizálható komponensek az illékony vagy illékonyra tehető komponensekhez képest nagyságrendekkel nagyobb száma miatt nincsen automatikus azonosítást lehetővé tevő adatbázis, az ionizációs/fragmentációs folyamatok, illetve ugyanarra a komponensre kapott tömegspektrumok a különböző készülékek/ionforrások szerint eltérőek lehetnek.

Metabolomikai ujjlenyomat készítés során elengedhetetlen a nagyfelbontású és nagy tömegpontosságú tömegspektrométerek alkalmazása. A prekursor ionok és azok fragmenteinek

pontos tömegének és izotopológ eloszlásának meghatározása által lehetőség nyílik a komponensek összegképletének meghatározására, illetve azonosítására. Az ilyen nagyfelbontású műszerek pl. a repülési idő (TOF), Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FT-ICR) és az orbitális ioncsapda (Orbitrap) analizátorokkal ellátott készülékek. TOF analizátor esetén a 10.000-20.000-es felbontás, 2-3 ppm-es tömegpontosság, FT-ICR készülékekénél az akár 1.000.000-s felbontás és <1 ppm-es tömegpontosság, Orbitrap analizátorok esetében pedig a 100.000-es felbontás és 1-2 ppm-es tömegpontosság jellemző (Xiao és mtsai., 2012).

Elterjedt a hibrid tandem (MS/MS) készülékek alkalmazása (QTOF, LIT-FT-ICR, LIT-Orbitrap), melyek segítségével a metabolitok prekursor ionjainak fragmentálása (MS^n) során azok kisebb alegységekre esnek szét, hozzájárulva ezáltal az anyaionok szerkezetének feltárásához és azonosításához. E készülékek közül a QTOF, azaz kvadrupol-repülési idő készülék viszonylag alacsony árfekvése és fenntartási költségei, valamint meggyőző paraméterei miatt az egyik legalkalmasabb és legelterjedtebb készüléktípus. Munkám során én is QTOF készüléket használtam, ezért ennek felépítését részletezem.

2.1.1.1.3 TOF és QTOF tömegspektrométerek jellemzői

A TOF és QTOF készülékekben az ionforrást követően valamilyen ionterelő, pl. oktopol vagy fűtött kapilláris helyezkedik el, ezt követi a két kvadrupol és a TOF analizátor majd pedig a detektorként alkalmazott elektronsokszorozó.

A TOF analizátor kialakításából eredő, legfontosabb előnyei a következők:

1. nagy tömegfelbontás és tömegpontosság: a TOF analizátor nagy felbontását az úgynevezett „delayed extraction” technikának és a repülési csőben alkalmazott reflektornak köszönheti. A TOF cső elején az ionnyalábok meglökésének pillanatában az ionok térbeli eloszlása nem egyenletes, ami időbeli eltérést okoz az ionok detektorba való becsapódásában, a delayed extraction pedig az első lökés után egy második lökés kiegyenlítő hatása által biztosítja a repülési idő eltéréseinek kiegyenlítését. A reflektoron a repülési cső végén elhelyezkedő „iontükrő”, mely visszaveri a rá érkező ionokat és továbbítja őket a detektor felé. A reflektoron az azonos molekulaionok repülési idejének eltéréseit egyenlíti ki azáltal, hogy míg a gyorsabb ionok mélyebbre jutva több időt, addig a lassabb ionok kevesebb időt töltenek el benne.

A repülési idő analizátorok második generációja jelentős előrelépést hozott a technika elterjedésében azáltal, hogy a korábbi készülékek viszonylag rossz tömegpontosságát sikerült korrigálniuk, mely a mérés közbeni körülmények ingadozásából és nem tökéletes izolálásából fakadt. A modern készülékekben ezt a hibát a mérés közbeni állandó tömegkorrekcióval küszöbölik ki. Gyártótól függően különböző technikai megoldások útján a HPLC-ből érkező eluensárammal egy időben referenciaoldatot juttatnak a

készülékbe, mely a mintával azonos időben ionizálódik és kerül detektálásra. Referencia tömegszámok detektálása szükséges, mert a repülési idő és az ionok m/z értéke közötti összefüggés exponenciális, így két mérési pont alapján az összefüggési egyenlet, vele együtt pedig a pontos tömeg is korrigálható a tömegspektrum egészére nézve.

2. széles tömegtartomány: a TOF analizátorok tömegtartományának elviekben nincs felső korlátja. A gyakorlatban 50-től 1700 vagy 3000 m/z értékig képesek a teljes tömegspektrum rögzítésére anélkül, hogy bármilyen információveszteség jelentkezne.
3. izotopológ arányok pontos meghatározása: a készülékben az ionforrástól az ionok ionnyalábokban jutnak el a TOF analizátorig, ahol e nyalábok egyszerre repülnek a repülési csőben, ezért egy molekulaion izotopológjainak aránya nagyon pontosan (kb. 2% relatív hibával) (Kind és Fiehn, 2006) meghatározhatók. Kvadrupol analizátorokkal szemben ez nagy előny, azok esetében ugyanis ez gondot jelent, hiszen a HPLC jelek tranziensek, így a külön m/z értékek detektálására szánt idő alatt a molekulaionok mennyisége változik, ami az izotopológok arányainak pontatlan meghatározásához vezethet.

2.1.2 Metabolomikai mintaelőkészítési lehetőségek

A metabolomikai ujjlenyomat-készítési vizsgálatok során alkalmazott mintaelőkészítési eljárások, csakúgy mint a mérés technikák kiválasztásánál tekintettel kell lenni arra, hogy metabolitok széles skálájának meghatározását kell lehetővé tenniük. Természetesen a mintaelőkészítésnek igazodnia kell a vizsgálat céljához és a rendelkezésre álló mérés technikához is (Dettmer és mtsai., 2007). Példának okául sok gyógynövényből, melyeket gyógyászati célból hasznosítanak vagy hasznosítani kívánnak, fontos, hogy a lehető legtöbb metabolitot kinyerjék, hiszen a cél hatóanyagok keresése és azonosítása, mert e növények hatása vélhetően nem egyetlen hatóanyagok köszönhető, hanem számos különböző komponens együttesének (Sheridan és mtsai., 2012). Ilyen esetben természetesen több mérés technika kombinált alkalmazása és ezeknek megfelelő több mintaelőkészítés szükséges. A következőkben mikroorganizmusok és növényi szövetek LC-MS alapú metabolomikai ujjlenyomat-készítése esetén rendelkezésre álló mintaelőkészítési lehetőségeket veszem sorra.

E mintáknál fontos szempont a minél egyszerűbb mintaelőkészítésre való törekvés, hogy a legkevésbé befolyásolják a minta összetételét, illetve ügyelni kell a minták metabolomjának stabilizálására. Ez növényeknél viszonylag egyszerűen megoldható, mintabegyűjtést követően -20 °C -on, hosszabb távon pedig -80 °C -on való fagyasztás ajánlott (Bollina és mtsai., 2011). Mikroorganizmusok intracelluláris metabolitjainak vizsgálata esetén az úgynevezett „quenching” (leállítási) eljárás javasolt, hogy a sejtek feltárására adott stresszreakció ne befolyásolja a metabolom összetételét. Ehhez feltétlenül szükséges a mikrobák és enzimeik aktivitásának

azonnali leállítása. A quenchingnek már számos formája ismert, legáltalánosabb módja a -20-40 °C-os metanollal való „fagyasztás” (Xu és mtsai., 2014). Extracelluláris metabolitok vizsgálata esetén elegendő csupán a komponenseket tartalmazó felülúszó elválasztása is a sejttömegtől, mely egyszerű centrifugálással és szűréssel kivitelezhető, quenchingre így nincs is minden esetben szükség.

2.1.2.1 Homogenizálás

Növényi szövetek homogenizálására számos lehetőség adódik. Akár fagyasztva tárolásuk után, akár pedig frissen szedett minták esetén a minták homogenizálása viszonylag egyszerű. A folyamat technikai kivitelezése azonban nagy körütekintést, gyors és magabiztos munkát igényel, hiszen a minták mennyisége limitált, mintagyűjtési lehetőség pedig legtöbbször évente egyszer áll rendelkezésre, továbbá a minták sérülékenyek, levegőn oxidálódnak stb. Általánosan bevett eljárás a minták kimérése után azok folyékony N₂-nel (-196 °C) való kezelése, ami a szövetek összetörését, porrá aprítását, az extrakciós felület növelését teszi lehetővé. Az aprítás leggyakoribb módjai: golyós malom (Jonsson és mtsai., 2004), dörzsmozsár (Weckwerth és mtsai., 2004), nagy teljesítményű aprítógép (pl. Ultra Turrax) alkalmazása (Roessner-Tunali és mtsai., 2004).

Mikroorganizmusok extracelluláris metabolitjainak vizsgálata során nincs szükség különösebb homogenizálásra, laboratóriumi rázógéppel (vortex) történő összerázást követően a minták homogénnek tekinthetők, megfelelő szűrést, hígítást és oldószer/eluens beállítást követően közvetlenül injektálhatók.

2.1.2.2 Metabolitok extrakciója

Növényi minták, illetve gyógynövények metabolomikai vizsgálata esetén találkozhatunk a következő mintaelőkészítési eljárásokkal is: főzetkészítés, víz:etanol eleggyel való macerálás (Li és mtsai., 2007), extrakció szuperkritikus folyadékkal (Khosravi-Darani, 2010; Liu és mtsai., 2008; Wang és mtsai., 2008), nagy nyomású forró vizes extrakció (Deng és mtsai., 2007), extrakció apoláris oldószerekkel (Li és mtsai., 2007).

LC-MS vizsgálatok esetén mindenképp folyadékfázisba kell átvinnünk a metabolitokat a mintaelőkészítés során, hogy injektálni tudjuk a mintákat. A mintaelőkészítés kiválasztásánál az is szempont, hogy milyen állófázison választjuk el az extraktumba átkerült komponenseket: C18-as fordított fázisú oszlopoknál például nem célszerű a vizes illetve poláros oldószerekkel végzett extrakció, hiszen az extrahált erősen poláros komponensek nagy része meg sem kötődik az oszlopon, így ez esetben megfelelő szelektivitás és érzékenység sem érhető el. A felsorolt eljárások közül a nem célzott metabolomikai vizsgálatok esetén legkézenfekvőbb a szilárd-

folyadék és a szilárd fázisú extrakció, a továbbiakban ezeket részletezem (Dettmer és mtsai., 2007).

2.1.2.2.1 Szilárd-folyadék extrakció

E módszert régóta alkalmazzák mintaelőkészítési eljárásként, mert nincs különösebben nagy eszköz és berendezés igénye, egyszerűen kivitelezhető. Metabolomikai vizsgálatok esetében fordított fázisú oszlopot alkalmazva a következő extrahálószer alkalmazása terjedt el: izopropanol, etanol, metanol, savas metanol (jellemzően hangyasav vagy ecetsav tartalmú, metil-észter képződés elkerülése végett), acetonitril (Aharoni és mtsai., 2002), víz, metanol:víz elegy, illetve erősen lipofil komponensek esetén etil-acetát vagy kloroform. Az extrakció hatékonyságának növelésére a minták rázása szükséges, mely történhet vortex-szel, ultrahangos szondával, temperálható rázógéppel (Thermomixer) stb. (t' Kindt és mtsai., 2008).

Az irodalomban számos növényi extrakciós eljárásra találunk példát: butil-hidroxi toluol (BHT) tartalmú metanolos extrakció (Prasad Maharjan és Ferenci, 2003; Schmitzer és mtsai., 2011), metanol:vizes extrakció (Bollina és mtsai., 2010), magas hőmérsékletű etanolos vagy metanolos extrakció (Bollina és mtsai., 2011; Castrillo és mtsai., 2003; Gonzalez és mtsai., 1997; Prasad Maharjan és Ferenci, 2003), extrakció acetonitril:víz eleggyel (50:50 % (v/v)), 0,2 % (v/v) hangyasav tartalom) (Vaidyanathan és mtsai., 2002), savas vagy bázisos kezelés (Prasad Maharjan és Ferenci, 2003), kloroform-metanolos extrakció (Prasad Maharjan és Ferenci, 2003; Ruijter és Visser, 1996), vagy savas metanol-diklórmétán-etil-acetát eleggyel történő extrakció (Smedsgaard, 1997).

Mivel számos lehetőség áll rendelkezésre, és nem létezik általánosan a legjobbnak elfogadott eljárás, t'Kindt és mtsai kiváló tanulmányában (t' Kindt és mtsai., 2009) sorra vette a növényi minták esetén rendelkezésre álló lehetőségeket és egy teszt minta alapján hasonlította össze azokat visszanyerés, reprodukálhatóság és hatékonyság alapján. *Arabidopsis thaliana* leveleiben található metabolitok fordított fázisú HPLC-s elválasztása esetén azt a következtetést sikerült levonnia, hogy az optimális mintaelőkészítés a következő:

1. Homogenizálás: minták eldörzsölése folyékony N₂-ben, dörzsmozsárban
2. Extrakció: 80:20 % (v/v) metanol:víz eleggyel, temperálható rázógéppben (15 perc, 4 °C), majd ultrahangos szondában (5 perc)
3. Centrifugálás (4 °C, 15000 g)

2.1.2.2.2 Szilárd fázisú extrakció

Szilárd fázisú extrakció folyamata során a mintában található komponensek egy szilárd (HPLC állófázisához hasonló) fázison kötődnek meg, a nem kívánt mátrixkomponensek pedig a komponensek eluálását nem eredményező mosási lépés segítségével a mintából eltávolíthatók. A

mátrixkomponensektől és ionszuppresszoroktól (pl. sók) való megszabadulás a minta tisztítását eredményezik, továbbá szükség esetén a kis koncentrációjú metabolitokra a minta töményíthető. LC-MS mérések során a sóatlanítás különösen előnyös, hiszen nagy só-tartalmú minták esetében (pl. vizelet) az ionforrás elszennyeződhet és mindez érzékenység romlást okoz.

A töltet típusától függően a komponensek *van der Waals* kölcsönhatás, dipol–dipol kölcsönhatás, hidrogén-kötés vagy elektrosztatikus erő segítségével kötődhetnek meg a tölteten. Jelenleg az SPE töltetek széles skálája érhető el kereskedelmi forgalomban, többek között a következő típusokban: szilika, alkilált szilika (pl. C18), szén alapú szorbensek, ioncserélő anyagok, polimerek, molekuláris lenyomatú polimerek (MIP-ek), korlátozott elérésű anyagok (RAM).

Egyre inkább elterjednek a polimerekből álló töltetek, melyeknek szélesebb a pH stabilitása, és nem annyira hajlamosak komponensvesztésre, ha a lépések közt kiszáradnak, mint az előbb felsorolt típusok. A divinilbenzén és N-vinilpirrolidon kopolimeréből készült töltetek (pl. Waters Oasis HLB – Hydrophilic-Lypophilic Balanced) hidrofil és lipofil komponensek egyidejű megkötésére is képesek.

Egyértelmű hátránya a módszernek, hogy a komponensek visszanyerése nem teljes, illetve bizonyos mértékű komponensvesztéshez vezet, hiszen a HPLC oszlopokhoz hasonlóan szelektívek bizonyos tulajdonságú komponensek körére. Alkalmazása viszont sok esetben előnyös, ha a minta töményítése, illetve tisztítása a cél (Dettmer és mtsai., 2007). C18-as töltet alkalmazása ideális választás, ha az SPE lépést C18-as HPLC elválasztás követi. Az egyes komponensek legnagyobb fokú tisztítását azonban úgy érhetjük el, ha ortogonális rendszerekben tisztítjuk a mintát, pl. ioncserés SPE-t követően fordított fázisú HPLC oszlopot alkalmazunk. Jelen példa esetén azért érhetünk el nagyobb tisztaságot, mert a fordított fázisú tölteten/oszlopon együtt eluálódó komponensek között lehetnek olyanok, melyek (pl. savas karboxil vagy bázikus karakterű N-tartalmú csoportjuknak köszönhetően) ioncserés tölteten/oszlopon más retencióval rendelkeznek, így eltérő időben eluálódnak.

2.1.3 Metabolomikai adatbányászat

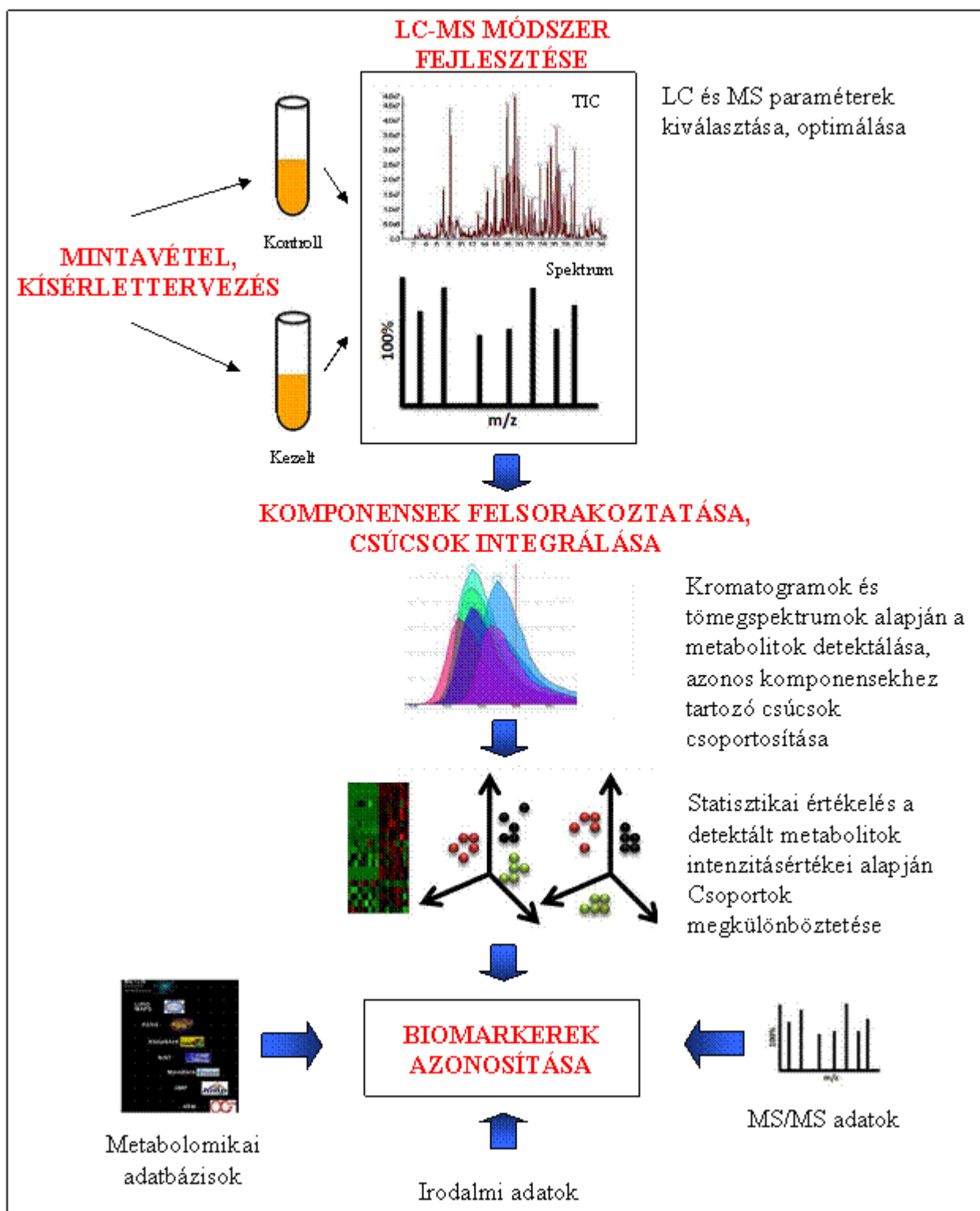
A nagyfelbontású tömegspektrometriás feladatok esetén megszokott, hogy nagy mennyiségű adat keletkezik, melyek kiértékelése sok időt, energiát és odafigyelést igényel. Nagy mintaszámok vizsgálata során hatalmas mennyiségű adat képződik, amely LC-MS csatolások esetében háromdimenziós adatsor formájában kerül rögzítésre. LC-MS mérési fájlok esetében a TOF vagy QTOF tömegspektrométerek jellemzően 1 másodperces ciklusidővel dolgoznak. Ez azt jelenti, hogy minden másodpercben 50-1700 m/z tartományban (tömegtartomány változhat), kb. 10000-es felbontás mellett rögzítik az adatokat, így egy LC futtatás alatt, annak

hosszúságától függően több ezer spektrumot rögzít a készülék (pl. 25 perces futás mellett kb. 1500-at). Az adatok nagy mennyiségét pedig jól jelzi, hogy a mérési fájlok mérete gigabájtos nagyságrendű.

Az ilyen adatsorok manuális kiértékelése nem teljesíthető feladat. Egy-egy mintában általában - köszönhetően a nagyfelbontású kromatográfiának és tömegspektrometriának - ezres nagyságrendben detektálunk komponenseket, mely adatsokaságból megfelelő kísérlettervezéssel és többváltozós statisztikai módszerek segítségével tudjuk kiszűrni az úgynevezett differenciáló komponenseket.

Az adatok kiértékelése a jelenleg elérhető kromatográfiás-tömegspektrometriás szoftverek, kiértékelő célszoftverek segítségével nagyságrendekkel hatékonyabb, mint a manuális adatfeldolgozás. Napjainkban a versenyképesség és az adatok kiértékelésének sebessége érdekében a metabolomika mindenképp megkívánja ezt a feltételt, illetve a célszoftverek iránti igényel megegyezően, a megoldható feladatok köre is egyre bővül. Ennek az igénynek a kiszolgálására jött létre a kemometria, melyen belül pedig léteznek kifejezetten a tömegspektrometriai, illetve a kapcsolt tömegspektrometriai technikák adatainak kiértékelésére alkalmas megoldások, szoftverek.

Metabolomikai ujjlenyomat-készítés esetén, mivel általában nem áll rendelkezésre különösebb információ a keresett komponensekről, mindenképpen „nem célzott komponenskeresés”, kereső algoritmus szükséges. Ilyen algoritmust tartalmazó szoftverek elérhetők a műszergyártóknál is és általában a saját műszereik által generált fájlokra optimaltak, ilyen pl. az Agilent MassHunter Qualitative AnalysisTM, a Waters MarkerLynxTM és MetaboLynxTM programja, a Thermo Scientific ExactFinderTM, az ABSciex MarkerViewTM programja stb. További lehetőség a készülégyártóktól független szoftverfejlesztők termékei. Ilyen, kereskedelmi forgalomban kapható szoftverek például az AMDIS (<http://www.amdis.net/>), MetaQuant (Bunk és mtsai., 2006), TagFinder (Luedemann és mtsai., 2008), MetaboliteDetector (Hiller és mtsai., 2009), XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>, ingyenes) stb. A nem célzott komponenskeresés menetét „general unknown screening”-nek, azaz általános ismeretlen keresésnek is nevezik. A metabolomikai ujjlenyomat-készítés munkamenetét a **4. ábra** szemlélteti.



4. ábra: Metabolomikai ujjlenyomatkészítés általános munkamenete (Lv, 2013).

E szoftverek hitelességét, automatizált működését azonban fenntartásokkal kell kezelni. A metabolomikában használható szoftverek nem validáltak, tehát hibátlan működésük nem garantált. Az algoritmusok hibákat ejtenek, amelyeket a gyártók többé-kevésbé igyekeznek javítani, azonban a hibák előfordulásával mindenképpen számolni kell.

2.1.4 Statisztikai kiértékelés

Miután a komponensek detektálása, sorba rendezése, kezelése megtörtént, az összes komponens azonosítása nem elvárt feladat, illetve túlnyomórészt nincs is értelme. Bizonyos kezelések, betegségek által kiváltott válaszreakciókra, vagy csak éppen fenotípusokra jellemző differenciáló komponensek keresése, kiszűrése és végül azonosítása a cél. Ennek megvalósítása különböző statisztikai módszerekkel megoldható, melyek legfőképpen az egyes komponensek különböző mintákban megjelenő intenzitás értékei, azok varianciája, szórása alapján működnek.

A megkülönböztető komponensek keresése nem egy adott hipotézis bebizonyítását szolgálja, hanem az adatokból való hipotézis, szabály alkotását. Tehát az azonosított, megtalált megkülönböztető komponensektől függ, hogy milyen következtetéseket vonhatunk le az eredmények láttán.

A nagyfokú biológiai variabilitásnak és a komponensek nagy számának köszönhetően azonban mindenképp szükséges az összehasonlításhoz a statisztika, hiszen a csoportok között minden bizonnyal olyan komponensek is előfordulnak, melyek nem szignifikánsak a megkülönböztetésben. Erre megoldást jelenthet pl. több biológiai párhuzamos minta vizsgálata, csoporton belüli gyakoriságvizsgálattal egybekötve (filter by frequency, Agilent terminológia). Az ezt követő t-próba vagy a komponensek intenzitásának hányadosa alapján történő szűrés (fold change analysis, Agilent terminológia) is elegendő lehet.

A csoporton belüli gyakoriságvizsgálat célja a biológiai mintákra általánosan jellemző, csupán biológiai variabilitásból eredően jelen lévő és megkülönböztető metabolitok kiszűrése. Ezeket a szoftver oly módon szűri ki, hogy a komponenseket csak akkor tekinti szignifikánsan megkülönböztetőnek, ha ugyanazon mintacsoport mindegyikében megtalálható.

A kétmintás t-próba a kezelt és a kontroll mintákban lévő ugyanazon komponensek intenzitásbeli középértékeinek eltérése alapján állapítja meg, hogy szignifikánsan különböznek-e egymástól ($p < 0,01$), tehát a csoportokat szignifikánsan megkülönböztető komponensről van-e szó. Az intenzitás hányadosainak meghatározása pedig egyszerűen ugyancsak egyazon komponens különböző csoportokbeli intenzitásértékeit hasonlítja össze. Azok hányadosát veszi, amely ha meghaladja az előre beállított küszöbértéket (esetemben az intenzitásarány ≥ 2), akkor szignifikánsan megkülönböztetőnek minősíti a komponenset.

Sok kísérlet megköveteli, hogy több tényezőt is bevonjunk a kísérlettervezés során (pl. egy csoporton belül a különböző súlyossági állapotokat, idő sorozatot stb.). A többváltozós (sokváltozós) statisztikai módszerek egyszerre nagyon sok változó vizsgálata által igyekeznek jellemezni megfigyeléseket, csoportokat, és próbálják meg a változókat vagy mintákat leképezni egy kis dimenziójú látens térbe. Metabolomika esetében a sok független változó a sok metabolitnak felel meg, melyek intenzitás értékei szolgálnak a kiértékelés alapjául. A

többváltozós adatelemzés különböző módszereket kínál, melyek lehetnek felügyelt (supervised) és nem felügyelt (unsupervised) eljárások. A nem felügyelt eljárások az összes mintából kiindulva, a változók értékei alapján próbálják viszonylag homogén csoportokba rendezni azokat (Berrueta és mtsai., 2007; Horvai és mtsai., 2001). Ilyen nem felügyelt eljárás pl. a főkomponens analízis (PCA) (Eriksson és mtsai., 2004; Jackson, 1991; Jansen és mtsai., 2004; Van Der Greef és Smilde, 2005) és a hierarchikus klaszter analízis (HCA) (Eisen és mtsai., 1998; Kachigan, 1991; Quackenbush, 2001).

A felügyelt eljárásoknál van információnk arról, hogy a minták mely csoportokhoz tartoznak, előzetesen általunk történik a minták csoportba sorolása. A felügyelt eljárások a csoportosított minták objektumaira kiszámítják a különböző csoportokhoz való tartozás valószínűségeit, így az adott mintatérben megítélhetjük a csoportosítás jóságát. Ide tartozik a részleges legkisebb négyzetek elvén alapuló diszkriminancia analízis (PLS-DA) (Sjostrom és mtsai., 1987) és a varianciaanalízis (ANOVA) (Kachigan, 1991; Smilde és mtsai., 2005).

A PCA-t és a hozzá hasonló ábrázoló modelleket gyakran alkalmazzák metabolomikai adatbányászatra és a csoportosítás értékelésére. A főkomponens analízis a rendelkezésre álló információt, azaz az adatmátrix összes változóját kevés, jellemzően két vagy három főkomponenssel leírható látens térbe sűríti (látens változók). Az új független változókat nevezzük főkomponenseknek, melyek egymásra merőlegesek. Mindegyik főkomponens rendelkezik egy értékvektorral és egy loadingvektorral. Az értékvektorok az eredeti adatok és a loadings lineáris kombinációi (sajátvektorok). A dimenziócsökkentés közben arra törekszik a modell, hogy az eredeti adatsor lehető legnagyobb varianciáját próbálja magyarázni. Az első főkomponens magyarázza az adatokban levő variancia legnagyobb részét, a második az elsőre merőleges és a második legtöbb varianciát magyarázza és így tovább. Az eredeti változók által meghatározott teret a főkomponensek segítségével alacsonyabb dimenziójú térbe vetítjük, mely látványos megjelenítési mód. Segítségével továbbá a kiugró értékek is jó eséllyel felismerhetők, illetve ami talán még fontosabb, hogy meghatározhatók azok a változók, amik a leginkább beleszámítanak a főkomponensekbe. A PCA mintavételi megfelelőségének indikátora a Kaiser-Meyer-Olkin mutatószám (Malhotra, 2005), értéke 0 és 1 között változik, mely alapján a PCA 0,5-ös érték felett mondható megfelelőnek (Griffiths, 2008; Horvai és mtsai., 2001).

PLS-DA esetén a látens változókat (érték és loading párok) úgy számolják ki, hogy a legnagyobb legyen a kovariancia az adatok és a csoportok kialakítása között. Ez utóbbi is egy nagy teljesítményű statisztikai eljárás, mely képes csoportokba sorolni a mintákat (Brindle és mtsai., 2002) és meghatározni mely változók alapján történt a csoportba sorolás (Bijlsma és mtsai., 2006).

2.1.5 Komponensek azonosítása

Az LC-MS alapú metabolomikai ujjlenyomatkészítés egyik legnagyobb hátránya, hogy az ionizáció és ebből következően az egyes komponensek fragmentációs képe, termékion spektruma nem jól reprodukálható (főként készülék- és mátrixfüggő). További probléma, hogy a rendelkezésre álló metabolit adatbázisokban lévő metabolitok száma limitált, és ha egy keresett komponens egyikben sem található meg, az azonosítás eredménytelenségéhez vezethet.

A komponensazonosításhoz mindenképp szükséges a nagy tömegfelbontás és a nagy tömegpontosság. A pontos tömeg önmagában azonban aligha lehet elegendő. Az azonosítás első fontos lépése a komponens összegképletének meghatározása, hiszen az összes adatbázis lehetőséget ad az egyszerű és egyben hatékony, elemi összetétel alapján történő keresésre, továbbá az összegképlet meghatározása után nagyságrenddel kevesebb lesz a lehetséges találatok száma. Egy komponens elemi összetételének meghatározásához a komponensek pontos izotópeloszlása (izotopológ eloszlás) az egyik legfontosabb minőségi paraméter a pontos tömegén felül, hiszen az izotopológok eloszlását a molekulát alkotó elemek természetes izotópeloszlása határozza meg. Kind és Fiehn arra a következtetésre jutottak, hogy az izotopológok eloszlásáról rendelkezésre álló információ nélküli, 1 ppm-nél kisebb tömegpontosságot felülmúlja, ha 3 ppm-es tömegpontosság mellé pontos izotopológ arány (max. 2% relatív hiba) társul. 500 Da feletti molekulatömegű komponensek esetében a hibás találatok 95%-a távolítható így el (Kind és Fiehn, 2006). A modern szoftverekben (pl. Agilent MassHunter Qualitative Analysis) az összegképlet generálás gyorsan és egyszerűen végrehajtható, mely folyamat során a szoftver kiszámolja a ring and double-bond equivalent (RDBE) értéket és figyelembe veszi a nitrogén szabályt is, mely ugyancsak tovább csökkenti a valós képletek számát. Az elméleti és tapasztalt pontos tömeg és izotopológ arányok közötti eltérést is figyelembe veszi a lehetséges összegképletek rangsorolásában. Miután meghatároztuk az összegképletet, számos (és egyre növekvő lefedettségű) metabolit adatbázis áll rendelkezésre, melyekben megkezdődhet a keresés. A leggyakrabban használt, interneten keresztül elérhető adatbázisokat gyűjtöttem össze az **2. táblázatban**.

Ha találunk egyezést egy adatbázisban (összegképlet, fragmentációs kép) minden kétséget kizáróan hiteles standard vegyület segítségével tudunk annak azonosságáról megbizonyosodni (Xiao és mtsai., 2012). A standardokat ideális esetben kereskedelmi forgalomban megvásárolhatjuk; ha nem elérhetők, akkor más kutatócsoportoktól, illetve kémiai szintézis által juthatunk hozzá, mely közül az előbbi nehézkes, illetve érdektükközés nehezítheti, az utóbbi pedig hatalmas költségeket emészthet fel, főleg ha több királis centrummal rendelkezik a molekula.

A komponenskeresés kimenetele többféle lehet, amelyek a következők (Sumner és mtsai., 2007, Werner és mtsai., 2008):

1. Egyértelmű azonosítás: Az előbb vázolt ideális esetben a mintában lévő komponens és a standard vegyület legalább két karakterisztikus tulajdonságának (retenciós idő ÉS tömegspektrum, vagy monoizotópos pontos tömeg ÉS fragmentációs kép) egyezése esetén (ugyanabban a kapcsolt LC-MS rendszerben összehasonlítva) teljes bizonyossággal azonosíthatjuk a komponensét.
2. Feltételes azonosítás: Hiteles standard vegyület hiányában fizikokémiai tulajdonságok (pl. kromatográfiás viselkedés) alapján és/vagy elérhető adatbázisokban való hasonlóság alapján vélhető azonosság állapítható meg.
3. Komponens típus feltételes azonosítása: Egy bizonyos komponens típusra jellemző fizikokémiai tulajdonságok alapján vagy bizonyos komponens típushoz tartozó ismert komponensek spektrális hasonlósága alapján meghatározható a komponens feltételezhető típusa.
4. Ismeretlen komponens: Az egyértelmű azonosítás nem lehetséges a rendelkezésre álló információk alapján.

A nagyfelbontású és pontos izotopológ arányok meghatározására képes tandem tömegspektrométerek közül a QTOF készülék az egyik legelterjedtebb és ár/érték arányban az egyik legjobb készüléktípus, ezen kívül a hibrid Orbitrap és az FT-ICR készülékek alkalmazása jellemző. A legtöbb esetben CID (collisionally induced dissociation) típusú fragmentálást végeznek, azonban egyes esetek megkövetelhetik más típusú fragmentálás szükségességét, pl. HCD (high energy collision dissociation) és ETD (electron transfer dissociation) fragmentálást.

Ha megbizonyosodunk arról, hogy egyik adatbázisban lévő találat sem felel meg a keresett komponensnek, a fragmentációs mintázatból megpróbálhatunk következtetni a molekula azonosságára, de egyértelmű azonosítása nem lehetséges. Ha viszont a komponens nagy mennyiségben van jelen a mintában és megfelelően kitisztítható, kellően nagy mennyiség (mg) nyerhető ki belőle, alkalmassá válik NMR készülékkel való vizsgálatra, mely remélhetőleg sikerre viszi az azonosítást.

2. táblázat: Legismertebb metabolomikai adatbázisok.

Adatbázis	Jelleg	Alkotó
BiGG	Humán	University of California (USA)
BioCyc (HumanCyc, MetaCyc)	Biokémiai útvonalak	SRI International (USA)
ChEBI	Általános	European Bioinformatics Inst. (UK) / European Molecular Biology Lab
ChemFinder	Általános	Cambridge Soft (USA)
CHEMnetBASE (Dict. Nat. Prod.)	Általános	Chapman & Hall/CRC
CSLS	Általános	CADD Lab. Med. Chem. NCI, NIH (USA)
Enhanced NCI Database Browser	Általános	CADD Lab. Med. Chem. NCI, NIH, Univ. of Erlangen-Nuremberg (Németo.)
Fiehn library	Általános	Fiehn Laboratory Univ. California Davis: Genome center
Golm	Növényi	Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology (Németo.)
HMDB	Humán	Human Metabolites Department of Computing Science, University of Alberta (Kanada)
KEGG ligand database	Általános	Kyoto University Bioinformatics Center (Japán)
KNAPSAcK	Természetes komponensek	RIKEN Plant Science Center (Japán)
LipidMaps	Lipidomika	Bioinformatics Core (USA)
LipidBank	Lipidomika	Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids (Japán)
Madison Metabolomics Consortium Database	Általános	National Magnetic Resonance Facility, University of Wisconsin-Madison (USA)
MassBank	Általános	Keio University, University of Tokyo, Kyoto University, RIKEN Plant Science Center (Japán) és mások
Merck Index	Általános	Merck Publishing
Metlin	Humán	Scripps Center for Mass Spectrometry (USA)
MoTo	Paradicsom metabolitjai	Wageningen University (Hollandia)
MSlib	Gyógyszer hatóanyagok	University of Alberta (Canada)
NIST	Általános	National Institute for Standard and Technology (USA)
PubChem	Általános	National Center for Biotechnology Information (USA)
SDBS	Általános	General National Inst. of Advanced Industrial Science and Technology (Japán)
SciFinder	Általános	American Chemical Society (USA)

2.2. Az emberi emésztőrendszer mikrobiomja

Az állati és emberi szervezetek a testük felépítéséhez, valamint a különböző élettévékenységeik energiaigényének fedezésére szolgáló tápanyagokat és vizet a külvilágból veszik fel. Az anyagok felvételére és feldolgozására szolgál az emésztőrendszer.

Az emberi emésztőrendszer a szervezet legnagyobb kiterjedésű, több mint 200 m²-es felületű nyálkahártyájával rendelkezik, tápanyagban rendkívül dús környezetet biztosítva ezáltal a mikroorganizmusok számára (Whitman és mtsai., 1998). A főbb emberi populációk között

három típust, úgynevezett enterotípust lehet megkülönböztetni, amelyeken belül ráadásul számos egyéb jellemző befolyásolja a mikrobiom összetételét. A mikrobiom összetétele egyénre jellemző, mely környezeti hatásokra is dinamikusan, akár napokon belül változik. A mikrobiom egyedi "mintázatát" a gazdaszervezet élettani jellemzői és egészségi állapota mellett, a bélfal és mikrobiom kölcsönhatása, valamint a mikrobák egymás közötti „szövevényes”, rendkívül összetett kölcsönhatása, számos külső környezeti faktor (pl. gyógyszerek, egyéb xenobiotikumok, szélsőséges táplálkozási szokások) és belső tényező (pl. az öregedés és vele együtt az immunrendszer gyengülése, stressz) együttesen alakítja (Walker és mtsai., 2006).

Az utóbbi évtizedben válik egyre szélesebb körben elfogadottá a tény, hogy az intesztinális rendszer mikrobiomja hatalmas szerepet tölt be az egészség megőrzésében, illetve a betegségek kialakulásában (Davis és Milner, 2009). Vannak rezidens, illetve átmenetileg felbukkanó tranziens mikrobák, melyek az elfogyasztott élelmiszer, víz és egyéb, külső környezetbeli forrásokból származhatnak, a rezidensek pedig jórészt állandóak.

A mikroorganizmusok természetesen nem egyenletesen oszlanak el a gyomor és bélcsatorna egészében. Az ember születése pillanatában csíramentes, a gasztro-intesztinális rendszert benépesítő mikrobák a külvilágból kerülnek oda (DeLong és Pace, 2001; Rappé és Giovannoni, 2003; Rondon és mtsai., 1999).

A gyomorban a nagy savtartalom és az emésztőenzimek antibakteriális hatása érvényesül, de ennek ellenére a gyomor mikroba populációja igen népes: *Proteobacterium*, *Bacteroides*, *Actinobacter*, *Fusobacterium* nemzetségek fajai népesítik be, kb. 10^1 - 10^3 /g béltartalom mennyiségben (Rozgonyi, 2006).

A bélrendszer jellegzetes az egyedi összetételéről. Szelekciós nyomások hatására csökken le a külvilágból érkező mikrobák diverzitása, ezáltal a felnőtt szervezet bélrendszerének mikrobiomját csupán néhány törzs dominálja (Bäckhed és mtsai., 2005; Eckburg és mtsai., 2005). A bélrendszer mikrobiális közösségében feltehetően szigorú követelményeket kell teljesíteni az állandó jelenléhez: enzimek egész kollekcijára van szükség a tápanyagok felvételéhez, sejtfelszíni molekuláris eszköztárra a „kedvező” élőhelyen való megmaradáshoz, az immunrendszer hirtelen reakcióinak ellenálló képességre, genetikai kellékekre, melyek által mutációval gyorsan adaptálódni tud a körülményekhez, gyors szaporodási képességre a kiürülés meggátlására, valamint jó stressztűrő képességre, hogy a száraz és toxikus, gazdaszervezeten kívüli környezetben is képes legyen a túlélésre, hogy aztán később másik gazdaszervezetbe is átjuthasson (Ley és mtsai., 2006).

A vékonybél az emésztőenzimek és az epe antibakteriális hatása miatt nem rendelkezik rezidens normál biótával, alacsony csíraszámú tranziens biótát tartalmaz, amelynek összetétele meglehetősen függ a fogyasztott tápláléktól: pl. azoknak, akik nagyobb mennyiségben

fogyasztanak húst, nagyobb számban tartalmaz a béltraktusa *Bacteroides* törzseket és kisebb a coliform ill. tejsavbaktériumok jelenléte, összehasonlítva azokkal, akik vegetáriánus étrendet követnek (Rozgonyi, 2006). A *duodenum*-tól kezdődően a béltraktus pH-ja folyamatosan emelkedik és a baktériumok száma is jelentősen megnő, így az *ileum*-ban az átlagos baktériumszám 10^5 - 10^7 / g béltartalom. Tovább haladva, a környezet egyre oxigénhiányosabbá válik és az anaerob baktériumok számára válik ideálissá (Madigan és mtsai., 2008).

A vastagbél óriási mennyiségben tartalmaz mikrobákat, tulajdonképpen olyan, mint egy „fermentációs üzem”, amelyben számos mikroba törzs dolgozik azon, hogy az emésztett táplálék maradék tápanyagait hasznosítsa. Normál mikrobiomja eddigi ismereteink szerint vegyes táplálékfelvétel esetén egységesnek tűnik. Meghatározó fakultatív anaerob mikrobája az *E. coli*, amely azonban kisebb számban van jelen (10^7 /g béltartalom) a többi baktériumhoz képest, hiszen a környezet az obligát anaerob baktériumoknak kedvez (95-99%), így a *Clostridium* és *Bacteroides* nemzetségek fajai dominálnak, míg a fakultatív anaerobok közül *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* nemzetségek a meghatározóak. Az *E. coli* és az *Enterococcus faecalis* a normál flóra részeként 10^9 /g ill. 10^3 /g béltartalom mennyiségben jelennek meg bélsárban. Az *Enterobacteriaceae* család többi nemzetsége csak tranzienst mikrobiom-alkotó. A *Bifidobacterium bifidum* és *Bacteroides fragilis* subspecielsei 10^{11} /g béltartalom mennyiségben vannak jelen a kialakuló székletben (Rozgonyi, 2006; van Hylckama Vlieg és mtsai., 2011).

2.2.1 Tejsavbaktériumok, *Lactobacillus casei*

A felsorolt és eddig bemutatott jelen lévő baktériumok között említettem a tejsavbaktériumokat is. A tejsavbaktériumok nem képeznek külön rendszertani kategóriát, hanem közös anyagcsere és élettani sajátosságokkal rendelkező baktériumcsoportok gyűjtőneve. Az ide tartozó baktériumok Gram-pozitív, spórákat nem képző, kataláz- és oxidáz-negatív pálcák vagy kokkusok, melyek szénhidrátokból szigorúan fermentatív módon nyernek energiát, melynek fő végterméke a tejsav.

A tejsavbaktériumoknak nincsenek citokrómjaik, nem aerobok és jól tolerálják a savas környezetet. Bár az anyagcseréjükhez nincs szükség oxigénre, képesek oxigén jelenlétében is növekedni (aerotoleráns anaerobok). Gram pozitív baktériumok, nem spóráképzők és az *Eubacteria* domén, *Firmicutes* törzséhez tartoznak, leggyakoribb fajai a *Lactobacillus*, *Streptococcus* és *Enterococcus* (The Prokaryotes, 2005).

A tejsavbaktériumokon belül az élelmiszeriparban betöltött fontos szerepük és ismert probiotikus tulajdonságaikon (Chaikham és mtsai., 2012) felül a *Lactobacillus* törzsek azért kapnak kiemelt figyelmet, mert rendkívül sokszínű az általuk előállított enzimek sora. Többek között a következő enzimaktivitást sikerült már megfigyelni korábbi tanulmányokban:

Lactobacillus acidophilus által termelt intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (Choonia és Lele, 2011), több *Lactobacillus* faj β -glükoronidáz aktivitása (McConnell és Tannock, 1993; Pham és mtsai., 2000; Russell és Klaenhammer, 2001), illetve *Lactobacillus plantarum* oleuropeináz és β -glükozidáz aktivitása (Ciardini és mtsai., 1994; Marsilio és mtsai., 1996).

2.2.2 Az emberi bélrendszer és a xenobiotikumok

A xenobiotikum környezetidegen, nem természetes, ember által szintetizált vegyi anyag. Görög eredetű kifejezés, melynek jelentése „idegen”. Megkülönböztetünk kémiai, fizikai és biológiai xenobiotikumokat is egymástól. A kémiai xenobiotikumok legfőbb forrásai gyógyszerek bejuttatásából, élelmiszer adalékanyagok elfogyasztásából, illetve ipari és mezőgazdasági tevékenység „szennyezéséből” fakad, pl. peszticid maradékanyagok jelenléte a zöldségek, gyümölcsök felületén.

A gasztro-intesztinális rendszer különösen ki van téve a külső környezetből érkező xenobiotikumok káros hatásainak, hiszen a legtöbb xenobiotikum szájon át történő elfogyasztás során kerül a szervezetbe, mely elsődlegesen, közvetlenül az emésztőrendszert érinti. A bélrendszer toxikológiai vizsgálata ezért különösen fontos, egyrészt, mint a xenobiotikumok célszerve, másrészt pedig mint a szervezetbe történő felszívódás helye.

A bélrendszert többféle módon is érhetik káros hatások. Ennek legnyilvánvalóbb módja az elfogyasztott xenobiotikumokkal való közvetlen érintkezés. Ezen felül azonban jelentős az olyan reaktív metabolitok formálódása, melyek a bélsejtek által expresszált, xenobiotikumokat lebontó enzimek tevékenységként képződnek, illetve a xenobiotikumok és a mikrobiom kölcsönhatásaként jelennek meg számottevő mennyiségben. A mikrobiális aktivitás ugyanis számos komponens, pl. élelmiszer- vagy gyógyszerösszetevő esetében nagyon erősen befolyásolja azok felvételét és metabolizmusát. Ez utóbbi mód igazán hangsúlyos, mivel a gazdaszervezet vérében lévő és a vastagbélben felszívódó metabolitok kb. 10%-a származik mikrobiális tevékenységből (Wikoff és mtsai., 2009). Kiváló példa erre, hogy több mint 30 olyan gyógyszerhatóanyag ismert, melyek bélrendszerbeli bakteriális enzimek szubsztrátjai lehetnek (Sousa és mtsai., 2008). A szakirodalomban pedig konkrét tragikus példát találunk arra is, miszerint a bélrendszer mikrobiótája által olyan káros metabolitok képződtek, melyek szervezetre kifejtett hatása több ember halálát okozta (Okuda és mtsai., 1998).

A bélrendszer lumenjében a belek nyálkahártyájának epitheliális rétege érintkezik először a toxikus komponensekkel. E réteg folyamatosan megújul a bél betüremkedéseiben található őssejtek által. A toxikus komponensek befolyásolhatják a betüremkedésekben található őssejteket, ezáltal pedig a szövet megújulási képességét, illetve a nem proliferáló elkülönült sejteket is. Utóbbi esetben az elkülönült sejtek, különösen a lumen felület epitheliális

sejtjeinek károsodása emelkedett permeabilitást eredményez, amely a potenciálisan toxikus komponensek nagymértékű és szabályozatlan felszívódását eredményezhetik a lumenből a véráramba, káros keringési tüneteket előidézve. Szerencsére a szomszédos sejtek károsodás-helyreállítási képessége azonban nagy, melynek köszönhetően az enyhébb sérülések okozta károsodások gyorsan (akár percekben belül) helyreállnak. Valószínűleg ez lehet az egyik oka annak, hogy egyes esetekben a bélrendszeri károsodások nem kimutathatók. Ezért ahhoz, hogy a toxikus anyagok számottevő mértékben károsítsák a vékonybelet, a sérülésnek meg kell haladnia a szomszédos sejtek helyreállító képességének mértékét vagy károsítaniuk kell az epitheliális sejteket, illetve a betüremkedésekben található őssejteket általi újratermelődésének kapacitását (Treinen-Moslen és Kanz, 2006).

2.2.3 Peszticidek

Peszticidek, azaz növényvédő szerek alatt különösen a nagy növénytermelő területeket érő állati és növényi kártevők ellen alkalmazott szintetikus kémiai anyagokat (növény-egészségügyi, -gyógyászati termékek) értjük, mely szerek maradékanyagi megjelenhetnek a növény és a belőle készült élelmiszerek felületén. A peszticideken belül a három legjelentősebb és legnépesebb tagú csoport a rovarirtó (inszekticid), gyomirtó (herbicid) és gombaölő szerek (fungicidek). Alkalmazásuk elterjedt a mezőgazdaságban, növényvédőszer nélkül a Föld népességének élelmezése nem lenne megoldható, hiszen jelentősen növelik a terméshozamot. A peszticidek alkalmazása jelenleg nem kiváltható, hiszen viszonylag olcsón és hatékonyan képesek vele növelni a terméshozamot és megvédeni a növényeket a kártevőktől. A jelenlegi volumenű növénytermesztés más módon nem kivitelezhető.

Hatásuk a mezőgazdasági termelés mellett azonban a környezetre nézve is igen jelentős, melyek a következők: élelmiszer-szennyezés, rezisztens fajok számának növekedése, házi- és vadállatok mérgezése, flóra és fauna egyensúlyi zavara, a mérgező anyagok felhalmozódása az ökoszisztémában (bioakkumuláció és bioamplifikáció a táplálékláncban).

Az emberre nézve veszélyt a növényvédő szerek közvetlen szennyeződés (bőrkontaktus, belélegzés, lenyelés) vagy szennyezett élelmiszereken keresztül, közvetett úton jelenthetnek. A legfontosabb elsődleges tünetek idegrendszeri, emésztési és légzési problémák formájában jelentkeznek.

A növényvédőszer piacra kerülésének engedélyezését szigorú ellenőrző vizsgálatok előzik meg, mely alapján előírják és meghatározzák az alkalmazható mennyiséget, a maradékanyagok maximális határértékeit és a betakarítás előtti kötelező várakozási időt.

Magyarországon 2004. május 1-től, az Európai Unióhoz való csatlakozástól kezdve, az addig érvényben lévő EÜM rendeletet (*Az élelmiszerek vegyi szennyezettségéről 17/1999. (VI. 16.)*

EüM rendelet | Jogszabályok az élelmiszer-gazdaságban, 1999) a növényvédőszer megengedhető maximális értékéről felváltotta az EU-ban 1991 óta hatályban lévő rendelet (*EUR-Lex - 31991L0414 - EN - EUR-Lex*, 1991). A rendelet meghatározza a peszticid és a maradék definícióját is. A peszticidek olyan „hatóanyagok és készítmények, amelyek egy vagy több hatóanyagot tartalmaznak olyan formában, ahogy a felhasználóhoz eljutnak”.

Az Európa Unió szabályozás alatt tartja a peszticidek felhasználását, mely szerint minden tagállam ugyanazokat a bírálati és engedélyezési eljárásokat kell, hogy használja a növényvédőszer piacra kerülése során. A peszticidekre vonatkozó kockázatbecslések elkészítése és az Európai Tanács döntéshozatali folyamataihoz szükséges tudományos háttér biztosítása az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (European Food Safety Authority – EFSA) feladata. A növényvédőszer veszélyességét fogyasztói szempontból az Európai Tanács által meghatározott Maximum Residue Limit (MRL) értékkel szokás jellemezni, mellyel maximalizálják az élelmiszerekben és takarmányokban, illetve az ezek felületén megengedett növényvédőszer maradékanyagok mennyiségét.

Az MRL szintet felügyeleti vizsgálatok alapján határozzák meg. A toxikológiai adatokból származtatják az ADI (érzékelhető káros egészségügyi hatás nélkül a szervezetbe juttatható átlagos napi felvétel) és az ARfD (Accut Reference Dose) értéket. Az ADI a krónikus toxicitást jellemző érték: egy hatóanyag becsült mennyisége az élelmiszerben testtömegre vonatkoztatva, amely napi érték egy életen keresztül történő elfogyasztható bármilyen észlelhető tünet kialakulása nélkül. Az ARfD az akut toxicitást jellemzi: egy hatóanyag becsült mennyisége az élelmiszerben testtömegre vonatkoztatva, egy étkezés alatt vagy rövid időn belül elfogyasztott élelmiszerrel szervezetbe vihető maximális érték. Az MRL (mg/kg) valamint az ADI illetve ARfD értékek sok esetben nem hasonlíthatók közvetlenül össze, mert a mg-ban kifejezett ADI és ARfD értékekben minden, a fogyasztásra kerülő élelmiszerben jelen lévő toxikológiailag szignifikáns szermaradék (hatóanyag és a metabolitjai vagy bomlástermékei) beletartozik. Ugyanakkor az MRL általában csak a nyerstermékben jelen lévő hatóanyag maradékát vagy egy jól definiált metabolitját (származékát) tartalmazza a nagyszámú hatósági ellenőrző vizsgálat megkönnyítésére.

Tekintve, hogy a megítéléshez felhasználható információ folyamatosan változik, ha szükséges, az ADI és ARfD értékek újraértékelésre kerülnek. Éppen ezért minden kimutatott peszticid új metabolitjainak detektálása, illetve a már ismert metabolitok új környezetben való megtalálása hasznos információval szolgál azok toxicitásának újraértékelésében, illetve a detoxikációs folyamatokról gyűjtött ismereteink bővítése szempontjából.

2.2.4 A peszticidek, mint a xenobiotikumok jelentős forrása

Az egészséges és kiegyensúlyozott táplálkozás részeként fontos a megfelelő mennyiségű zöldség illetve gyümölcs fogyasztása. Napjaink velejárójaként azonban számolni kell a felületükön maradt növényvédőszer maradékanyagok és azok metabolitjainak jelenlétével, melyek a gasztro-intesztinális rendszerbe kerülő xenobiotikumok, illetve azok prekursorainak jelentős mennyiségét képviselik. A peszticidek nagymértékű felhasználását egyre növekvő társadalmi aggályok övezik, mivel sok, emberi egészségre káros hatást tulajdonítanak ezeknek a bioaktív vegyszereknek (European Parliament, E. C., Regulation (EC) No. 396/2005, 2005; Golden és Kimbrough, 2009).

Mindezen felül számos szervezet mikrobiótáját érinti a peszticid okozta stressz, mivel a nem megfelelő takarmány- és élelmiszer-feldolgozás következtében könnyen érintkezhetnek egymással (Abou-Arab, 2002). Számos példa található a szakirodalomban, mely szerint a jelen lévő peszticidek befolyásolják a tej- és hústermékek előállításánál alkalmazott mikrobiótát: igazolták például, hogy a tejsavbaktériumok szaporodására és anyagcseréjére is érdemi befolyással vannak (Ayana és mtsai., 2011; Clair és mtsai., 2012).

A baktériumok és peszticidek kölcsönhatásának különféle élelmiszerekben, zöldségek és gyümölcsök felületén is megvan az esélye, mely találkozás eredményeképp xenobiotikumok képződnek, melyek elfogyasztásuk után a bélrendszert újabb expozíciónak és káros hatásoknak tehetik ki. Ilyen esetekre is találunk példát a szakirodalomban, ahol több baktériumra, élesztőgombára, közöttük *Lactobacillus* törzsekre peszticidek által kifejtett változásokat, hatásokat regisztráltak (Ayana és mtsai., 2011; Sharma és mtsai., 2008).

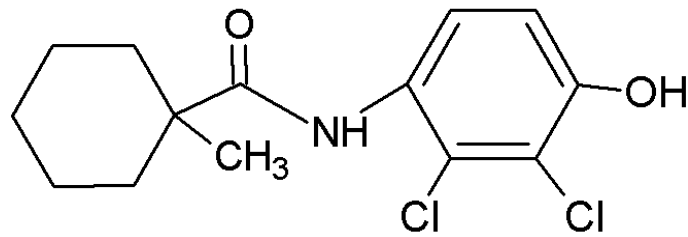
Ugyancsak jelentős megfigyelés, hogy a mikroorganizmusok is befolyásolják a peszticidek és származékaik hatásmechanizmusát. Hústermékek előállításánál alkalmazott tejsavbaktériumok képesek lebontani a környezetükben jelen lévő peszticideket, mely a vélhetően csökkent toxicitás miatt, konkrét esetben épp pozitívan befolyásolják a termék minőségét (Abou-Arab, 2002); az esetek többségében viszont az ellenkezője áll fenn.

2.2.4.1 Fenhexamid

Munkám során fenhexamiddal folytattam kísérleteket, ezért disszertációmban csupán e szer leírását és tulajdonságait részletezem, illetve arra is kitérek, hogy az összes peszticid közül miért esett választásom a fenhexamidra.

A fenhexamid (**5. ábra**, N-(2,3-dikloro-4-hidroxifenil)-1-metilciklohexán karboxamid; $C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$; CAS száma: 126833-17-8,) egy vízben alig oldódó, hidroxil-anilid gombaölőszer, melyet rendkívül széles körben alkalmaznak világszerte számos kertészeti növény, zöldség és gyümölcs esetében (EFSA, 2013). A jelenleg érvényben lévő EU szabályozás szerint e hatóanyag rendelkezik az egyik legmagasabb MRL értékkel, mely maximális értéke egyes

esetekben a 40 mg/kg értéket is eléri. Továbbá, nemrég látott továbbá napvilágot egy vonatkozó állásfoglalás, miszerint az EFSA engedélyezi a jelenlegi MRL érték további növelését néhány gyümölcs esetében (EFSA, 2013).



5. ábra: Fenhexamid szerkezeti képlete.

Bár a fenhexamid 1998-ban került bevezetésre, a nem célszervezetekre kifejtett hatásáról igen kevés információ áll rendelkezésre (Russell, 2005). Mivel a xenobiotikumok humán mikrobiotára kifejtett hatása (Johnson és mtsai., 2012), valamint a gyümölcsökön és zöldségeken található fenhexamid maradékanyagok mennyisége is jelentős (Angioni és mtsai., 2004; Kmellár és mtsai., 2010), a *Lactobacillus casei* által metabolizált fenhexamid anyagcseretermékek és lehetséges detoxikációs termékek vizsgálata releváns témát képvisel.

A komplex mintamátrixban előforduló, feltételezhetően kis koncentrációban megjelenő metabolitok meghatározása, bár bonyolult és kihívást jelentő feladat, metabolomikai adatbányászatra alkalmas algoritmusok, szoftverek, megfelelő statisztikai kiértékelés és kromatográfiához kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometriás eljárások (LC-ESI-QTOF-MS vagy LC-ESI-Orbitrap-MS) segítségével lehetséges. Mi sem bizonyítja ezt jobban, minthogy sikeresen alkalmazták már e technikákat korábbi tanulmányok során: ahol például hüvelyes növények és *Rhizobium* baktérium fajok közötti szimbiózisát (Zhang és mtsai., 2012) és béta-laktám antibiotikum patkányok mikrobiomjára (Zheng és mtsai., 2011) gyakorolt hatását vizsgálták metabolomikai vonatkozásban.

2.3. *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfák önmeddőségének genetikai háttere

A *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfák ivari összeférhetőségének hátterében álló molekuláris folyamatok tanulmányozása több mint két évtizedet ölel át. Bár a bibe- és pollenkomponens géneket már azonosították, azok pontos kölcsönhatásai továbbra is tisztázatlanok. Egyre több adat arra enged következtetni, hogy az *S*-lókuszon kívüli egyéb lókuszok is döntő befolyást gyakorolnak az önmeddő/öntermékenyülő fenotípus kialakulására, bár gyümölcsfák esetében ilyen módosító lókuszokat még nem sikerült izolálni. A növénytudomány e területe gazdasági jelentőségén túl, a molekuláris hálózatok és a növények evolúciós történetének feltárásában is fontos szerepet játszhat.

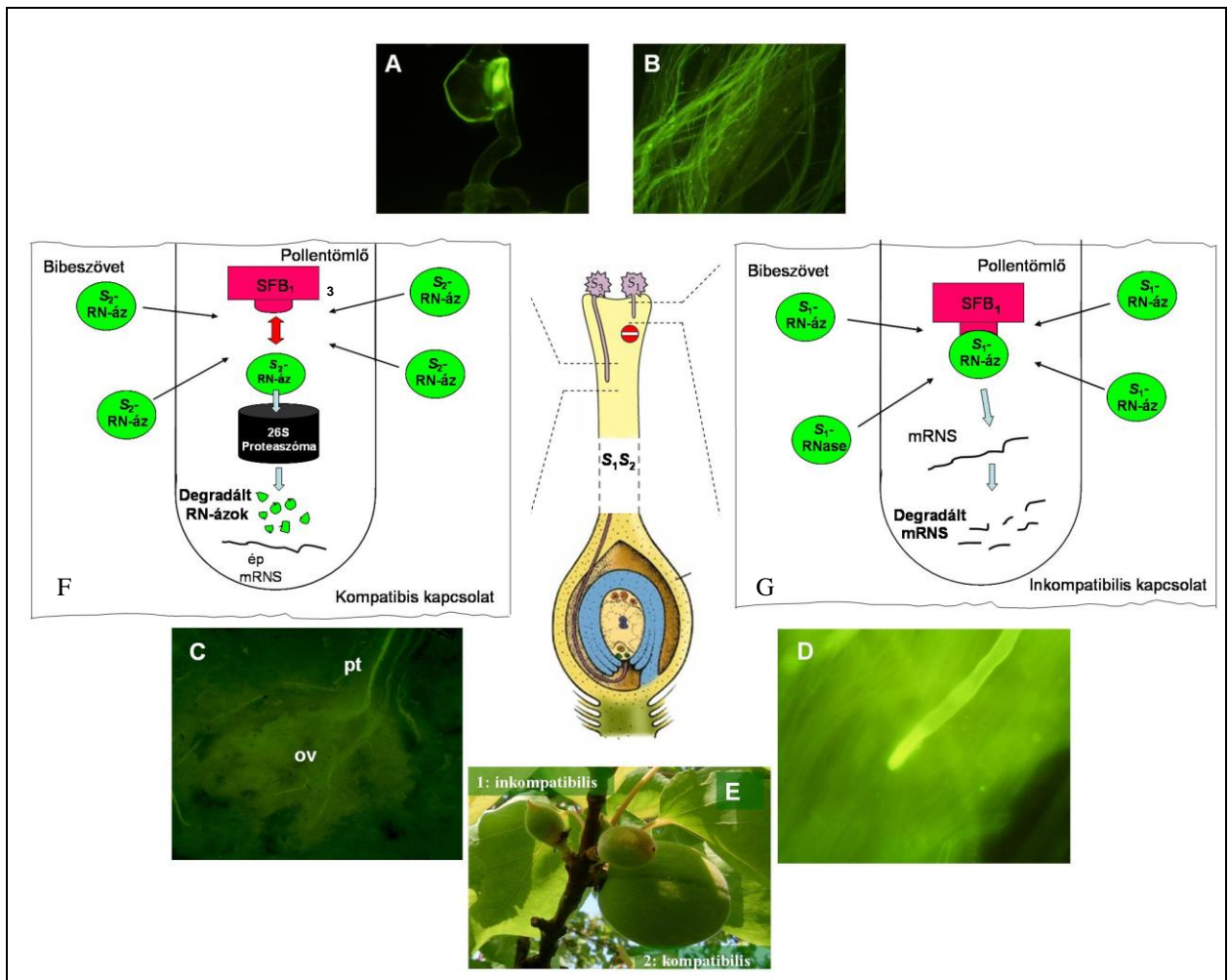
A *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfák a *Maloideae* (alma, körte és birs) illetve *Prunoideae* (cseresznye, kajszi, őszibarack, mandula és szilva) alcsaládokba sorolhatók. Valamennyi fajt gyümölcséért, illetve magjáért termesztik a mérsékelt égövi területek nagy részén. Mivel a partenokarpia ritkán (*Maloideae*), vagy egyáltalán nem következik be (*Prunoideae*), a kötődött gyümölcsök mennyisége a megtermékenyítés eredményességén múlik. A teljes virágokban mindkét ivarszerv, a bibe és a porzók is megtalálhatók. Az ivarszervek egymás közelében helyezkednek el, ezáltal a pollenszemek ugyanazon virágon belül könnyedén átkerülhetnek a bibére. Mindez öntermékenyülést eredményezne, amely hosszú távon kedvezőtlen az egyedek életképességére, illetve a populációk genetikai alapjára (Good-Avila és mtsai., 2008). Az öntermékenyülés növelné a homozigóták számát, és jelentősen korlátozná a variabilitást, ezáltal rontaná a populáció jövőbeli alkalmazkodóképességét. Az egyes növényfajok ezért különböző gátló mechanizmusokat fejlesztettek ki az öntermékenyülés megakadályozására, melyek lehetővé teszik a kellő mértékű idegenmegporzást. Ez a genetikailag meghatározott mechanizmus a *Rosaceae* családban gametofitikus, a *Brassicaceae*-ben sporofitikus szabályozású (Nettancourt, 2001). A gametofitikus önmeddőség szerint (GSI) a pollen fenotípusát saját haploid genotípusa határozza meg. A *Rosaceae* családban a GSI a polimorf *S*-lókusz (nevét a sterilitás szóról kapta) szabályozása alatt áll.

2.3.1 A gametofitikus önmeddőség pollen és bibe között lejátszódó reakciói

A megtermékenyítés gátolt, ha a haploid pollenszem *S*-allélja megegyezik a bibében kifejeződő két (vagy poliploid fajok esetében több) *S*-allél egyikével (**6. ábra**). Az *S*-lókusz allélsorozatát különböző betűkkel vagy számokkal jelölik. Egy S_1S_2 genotípusú növény S_1 vagy S_2 allélt hordozó pollenszemei inkompatibilisek az S_1S_2 genotípusú növény bibéin. Ha két különböző fajta azonos *S*-genotípussal rendelkezik, akkor kölcsönösen meddők (SI), más szóval inter-inkompatibilisek. A bibe felületén mind az inkompatibilis, mind a kompatibilis pollenszemek kicsíráznak (**6a. ábra**). Ha a pollenszemek a bibeszövetektől eltérő allélokat hordoznak, akkor azon a bibén kompatibilisek (**6b. ábra**). A kompatibilis pollentömlő eléri az embriózsákot (**6c. ábra**), az inkompatibilis pollentömlőkben viszont nagy mennyiségű kallóz halmozódik fel (Halász és mtsai., 2007; Milatović és Nikolić, 2007), ezáltal növekedésük még a bibeszálban megtorpan (**6d. ábra**). Az inkompatibilis megporzásból származó gyümölcsök néhány hét elteltével lehullanak a fáról (**6e. ábra**).

Az utóbbi két évtizedben jelentős előrelépés történt a GSI molekuláris alapjainak megismerése terén. Az önmeddőségi reakciók a bibe *S*-ribonukleáz (*S*-RNáz) (McClure és mtsai., 1989) és a pollenben kifejeződő *S*-haplotípus specifikus F-box (SFB) fehérjék között játszódnak le (Entani és mtsai., 2003; Lai és mtsai., 2002; Ushijima és mtsai., 2003). Az *S*-RN-

ázok bázikus glikoproteinek, melyek a bibeszál sejtszövetében termelődnek és a gomba T2 RN-ázok aktív csoportjára jellemző szekvenciamotívumokat tartalmaznak (Broothaerts és mtsai., 1995; Kawata és mtsai., 1988). Kimutatták, hogy az RN-áz aktivitás döntően befolyásolja az inkompatibilitási választ (Huang és mtsai., 1994), mely során a pollen RNS-eit hasítják a bibe RN-áz enzimeik. Az *Antirrhinum* és *Prunus* pollenkomponenseként egy *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérjét kódoló gént (*SFB* vagy *SLF*) azonosították, mivel e gén alléljait az *S*-RN-áz allélokhoz hasonlóan nagymértékű variabilitás jellemzi, illetve kizárólag a pollenben fejeződik ki (Entani és mtsai., 2003; Lai és mtsai., 2002; Sijacic és mtsai., 2004; Ushijima és mtsai., 2003). Transzgenikus *Petunia* növényben igazolták, hogy az *SLF* gén szükséges az önmeddőség kialakulásához. Az F-box fehérjék az ubiquitin-ligáz komplexeknek is alkotói, melyek a 26S proteasóma általi fehérjelebontásban játszanak szerepet (Hershko és Ciechanover, 1998), az önmeddőség hátterében álló folyamatok modelljében pedig az *S*-RN-áz enzimek lebontásáért tették felelőssé ezeket a fehérjéket.



6. ábra: A gametofitikus önmeddőség pollen és bibe között lejátszódó reakciói (Lénárt és mtsai., 2011). A bibe felületén mind az inkompatibilis, mind a kompatibilis pollenszemek kicsíráznak (A). Ha a pollen által hordozott *S*-allél különbözik a bibe mindkét *S*-alléljától, a pollentömlő fejlődése zavartalan (B). A kompatibilis pollentömlők (pt) egyike eléri az

embriózsákat (ov), és megtörténik a megtermékenyítés (C). Ha a pollen által hordozott *S*-allél megegyezik a bibében található bármelyik *S*-alléllal, a pollentömlőkben nagy mennyiségű kallóz halmozódik fel, és növekedésük megtorpan a bibeszálban (D). Az inkompatibilis megporzásból származó kis méretű gyümölcsök kb. 30 nappal a megporzást követően lehullanak, míg a kompatibilis megporzásból származó gyümölcsök megfelelően fejlődnek (E). A kompatibilis (F) és inkompatibilis (G) fenotípus háttérében álló molekuláris folyamatok.

2.3.2 A pollen és bibe *S*-fehérjei között lejátszódó molekuláris kölcsönhatások lehetséges modelljei

Több lehetséges modell is napvilágot látott az önmeddőségi reakció mögött meghúzódó molekuláris kölcsönhatások leírására (Hua és mtsai., 2008). Azt követően, hogy az *SFB* fehérjét, az *S*-lókusz pollenben kifejeződő termékeként azonosították, valószínűnek tűnt, hogy az *SFB* poliubikvitinálja az idegen *S*-RN-ázokat, melyek bejutnak a 26S proteaszómába, és ott lebomlanak. Mindez lehetővé tenné az idegen *S*-RN-ázok inaktiválását (Ushijima és mtsai., 2004). A saját *S*-RN-ázok működését azonban nem érintené ez az *S*-haplotípus-specifikus kölcsönhatás, ami az önmeddőség kialakulásában jelentkezne. A módosított inhibitor modell szerint az *S*-allél pollenben kifejeződő terméke egy allélspecifikus domént hordoz, de az *S*-RN-ázok tényleges gátlásáért egy, az *S*-lókusztól független, ún. általános inhibitor rendszer felelős (Luu és mtsai., 2001). Ez az általános inhibitor gátolná minden *S*-RN-áz működését, azon *S*-RN-ázok kivételével, melyek a pollenben kifejeződő, ugyanazon allél által kódolt fehérjékhez kötődnek. Qiao és mtsai. (2004) igazolták, hogy *Antirrhinum* esetében az ubikvitin/26S proteaszóma rendszer működése a kompatibilis reakciókhoz nélkülözhetetlen, de az inkompatibilis reakciók a rendszer mesterséges gátlásakor is kialakulnak. Az előbb ismertetett modellel (Ushijima és mtsai., 2004) szemben Sonneveld és mtsai. (2005) szerint az *SFB* nem felelős az idegen *S*-RN-ázok inaktiválásáért, mert azt egy, a pollentömlőkben működő általános inaktivációs mechanizmus látja el, ugyanakkor a reakció specifikusságát az *SFB* biztosítja.

Ez a hipotézis összeegyeztethető a módosított inhibitor modellel (Luu és mtsai., 2001). Az elméletet alátámasztja, hogy az eredeti inhibitor modell szerint az *SFB* gén funkcióvesztése teljes körű inkompatibilitáshoz vezetne, mivel a pollentömlőkből hiányozna az *S*-RN-ázok aktivitását gátolni képes mechanizmus. Ezzel szemben azonban a magyar 'Alex' nevű, öntermékenyülő cseresznyefajta vizsgálata alapján kiderült, hogy a mutációs nemesítés során alkalmazott röntgensugárzás hatására a teljes *SFB* génszakasz delécióét szenvedett (Sonneveld és mtsai., 2005). Az *SFB* gén hiánya azonban nem teljes körű inkompatibilitást, hanem öntermékenyülést idézett elő. Az új modell szerint az *SFB* fehérjék szerepe, hogy megvédjék saját (velük egyező allél által kódolt) *S*-RN-ázukat a degradációtól, és nem az, hogy megindítsák az idegen *S*-RN-ázok lebontását (Sonneveld és mtsai., 2005). E modell értelmében akkor következik be

önmeddőség, ha az azonos allél által kódolt *S*-RN-áz és SFB fehérjék stabil komplexet alkotnak, és ezáltal az *S*-RN-ázok elkerülik, hogy a pollentömlőben működő általános inaktivációs mechanizmus során degradálódjanak (**6g. ábra**). Ebből következően a sértetlenül maradt *S*-RN-ázok le tudják bontani a pollen RNS-eket, ami megakadályozza a fehérjeszintézist, ezáltal a pollentömlő növekedését. Kompatibilis kapcsolat esetén a különböző allélok (vagy ugyanazon allél, ha az egyik gén funkcióvesztéses mutációt szenvedett) által kódolt *S*-RN-áz és F-box fehérje nem képes stabil kötést kialakítani. Következésképpen az *S*-RN-ázok poliubikvitinálódnak és lebomlanak, tehát a pollen RNS sértetlen marad, a fehérjeszintézis és a gyümölcskötődés zavartalan lesz (**6f. ábra**). Néhány részlet azonban még tisztázásra szorul, mely további biokémiai vizsgálatokat igényel.

Goldraj és mtsai. (2006) szerint a *Nicotiana* nemzetségben az önmeddőség háttérében másféle molekuláris folyamatok állnak. E modell értelmében a kompatibilitást nem az *S*-RN-ázok lebontása idézi elő, hanem azok kompartmentalizációja. A bibe sejtjei az *S*-RN-ázok mellett egy HT-B és egy 120 kD glikoprotein – bővebben lásd: Cruz-Garcia és mtsai. (2003) – fehérjét is kiválasztanak a sejtek közötti térbe. Ezek a fehérjék endocitózissal jutnak be a pollentömlőbe, majd annak a vakuólumába kerülnek. A kompatibilis pollentömlőkben egy eddig ismeretlen pollen fehérje (PP) lebontja a HT-B molekulákat. A HT-B hiányában az *S*-RN-áz a vakuólumban marad, amely kompatibilis reakcióhoz vezet. Az *S*-RN-ázok tehát jelen vannak és stabilak, citotoxikus hatásuk mégsem érvényesül, mert a pollentömlő működése szempontjából kritikus sejten belüli színterektől elzárva helyezkednek el. Az önmegporzás során a PP nem képes a HT-B-t lebontani, így a vakuólumok membránja sérül. Miután az *S*-RN-ázok kiszabadultak a vakuólumból, megzavarják a pollentömlő működését, ami egy önerősítő mechanizmust hoz létre. Az *S*-RN-ázok és SFB-k közti kezdeti kölcsönhatásokat még nem ismerjük, bár e két molekula között valamilyen kapcsolat szükségesnek látszik ahhoz, hogy a reakciósor későbbi lépéseit a kompatibilis vagy inkompatibilis válasz irányába terelje. Napjainkban még kérdéses, hogy a *Solanaceae* családban leírt intracelluláris eseményeknek lehet-e szerepük az önmeddő/öntermékenyülő fenotípus kialakítása során a *Rosaceae* család egyik, másik, esetleg mindkét alcsaládjában.

2.3.3 Az *S*-lókuszon kívüli molekuláris kölcsönhatások és jelátviteli folyamatok a *Rosaceae* családban öntermékenyülés és idegen megporzás esetén

Egyre több közlemény valószínűsíti, hogy az *S*-lókuszon kívül más gének is szerepet játszhatnak az önmeddőség kialakításában (Cachi és Wunsch, 2011; Martí és mtsai., 2009; Wu és mtsai., 2011). A *Solanaceae* családra jellemző önmeddőségi rendszerrel kapcsolatban fény derült több, ún. módosító gén funkciójára. Ide tartozik például a 120 kDa-os glikoprotein (120 K), egy kisméretű, aszparaginban gazdag HT fehérje, és a PELPIII nevű fehérje (Cruz-Garcia és

mtsai., 2005, 2003), továbbá egy izoflavon-reduktázhoz hasonló CP100 fehérje, és az endomembrán rendszer fehérjéi (Kumar és McClure, 2010). Mostanáig e fehérjék egyikét sem sikerült gyümölcsfák bibeszöveiből izolálni. Az ön- és keresztmegporzást követő proteomikai változások föltérképezése lehetőséget kínál a gyümölcsfák önmeddő/öntermékenyülő fenotípusának kialakításában szerepet játszó egyéb lókuszok azonosítására.

Feng és mtsai. (2006) az önmeddő kajszifajták bibéinek ön- és idegenmegporzását követő proteomikai változásokat vizsgálták kétdimenziós gélelektroforézissel és folyadékromatográfiás elektropray ioncsapda tandem tömegspektrométerrel (LC-ESI-IT-MS/MS). Kilenc fehérje kizárólag az önmegtermékenyített bibékben, illetve egy kizárólag az idegenmegporzást követően fejeződött ki. Az öntermékenyüléshez képest idegen megporzás hatására 16 fehérje mennyisége megnőtt, három fehérje mennyisége azonban csökkent. Hét fehérjét sikerült egyértelműen azonosítani a SEQUEST szoftver és az NCBI fehérje adatbázis használatával: az aktin-12, enoláz, MYB transzkripciós factorszerű fehérje és a Hsp70 hősokkfehérje mennyisége idegen megporzást követően nagyobb volt, mint öntermékenyülés esetén, míg az aktin-7, aktin-8 és egy fruktóz-biszfoszfát-aldolázhoz hasonló fehérje kizárólag önmegporzást követően jelent meg.

Az aktinok igen konzervált fehérjék, melyek a sejten belüli mozgásban játszanak szerepet, és minden eukarióta sejtben megtalálhatók (Hall, 1998). A sejtvázas alkotóiként fontos szerepet játszanak a citoplazmatikus áramlásban, az organelumok mozgásában és a megnyúlások növekedésben. Az aktinból felépülő sértetlen citoskeleton alapvetően fontos a pollen csírázásához és a csúcsnövekedéshez (Taylor és Hepler, 1997). *Papaver rhoeas* növényben igazolták, hogy az önmeddőség az aktinmolekulák depolimerizációjával jár, az aktin mennyiségében illetve működésében bekövetkező változások alapvető szerepet játszanak a pollentömlőben a programozott sejthalál (PCD) kiváltásában (Thomas és mtsai., 2006). A közelmúltban igazolták, hogy a PCD a *Pyrus pyrifolia* inkompatibilis pollentömlőiben is kialakul (Wang és mtsai., 2009).

A HSP 70 hősokkfehérje a dajkafehérjék (molekuláris chaperonok) családjába tartozó stresszfehérje, melynek expresszióját a fejlődési állapot és nem a különböző stressztényezők szabályozzák. A fehérje fokozott termelődése meggátolja a stressz hatására károsodott fehérjék összetapadását azáltal, hogy elősegíti a naszcens fehérjék tekeredését, illetve a károsodott fehérjék megsemmisítését (López és mtsai., 2002). Az MYB az egyik legnagyobb transzkripciós faktorcsalád, melyek számos gén transzkripcióját szabályozzák (Ito, 2005). A MYB transzkripciós faktorhoz hasonló fehérje szerepe az öntermékenyülő kapcsolat során még nem ismert. Kimutatták azonban, hogy egy, a MYB transzkripciós faktorokhoz hasonló fehérje különbözőképp fejeződött ki az öntermékenyülő és önmeddő kölcsönhatások során (Feng és mtsai., 2009).

Ugyanezen szerzők egy későbbi közleményben újabb fehérjékről számoltak be, melyek eltérő módon fejeződnek ki a kajszi bibékben ön- illetve idegentermékenyülést követően (Feng és mtsai., 2009). Összesen 30 ilyen fehérjét mutattak ki kétdimenziós gélelektroforézis vizsgálattal, melyek közül 18-at sikerült egyértelműen azonosítani LC-ESI-MS/MS, illetve az NCBI adatbázist használó SEQUEST keresés alapján. Ezekből kilencet (köztük egy kináz típusú receptor fehérjét, egy izoflavon-reduktáz típusú fehérjét és egy ribózfoszfát-pirofoszfokinázt) kizárólag az önmeddő fajták öntermékenyített bibéiben mutattak ki. Érdekes, hogy az utóbbi fehérje a közelmúltban közzétett őszibarackgenom 3-as kapcsoltsági csoportjára térképeződik, hasonlóan ahhoz a még nem azonosított génhez, mely a 'Cristobalina' nevű cseresznyefajta öntermékenyülését idézi elő (Cachi és Wunsch, 2011).

Hat másik fehérjét, köztük az aktin-7-et és egy feltételezett szerin/treonin-kinázt kizárólag az inkompatibilis kapcsolat során találtak meg. Öntermékenyülést követően egy mitokondriális NAD-függő almasav-dehidrogenáz és egy elongációs faktorhoz hasonló fehérje mennyisége növekedett meg, míg inkompatibilis kapcsolat esetén egy, a Hsp70-nel rokon fehérje akkumulálódott. Érdekes, hogy dohánynövényben a PCD hatására jelentős mértékű fehérjedegradáció következett be, de néhány fehérje (pl. a Hsp70) mennyisége nem csökkent (Chaves és mtsai., 2011).

Mindezen eredmények azt sejtetik, hogy a kompatibilis és inkompatibilis kölcsönhatások lejátszódását megelőző, illetve követő molekuláris folyamatokban különböző fehérjék vehetnek részt. Az *S-RN-áz* gén transzkripciója nagyobb mértékű az önmeddő, mint az öntermékenyülő egyedek bibeszövetében (Feng és mtsai., 2009). Feltételezhető, hogy az önmeddő kajsziiban az *S-RN-áz* szabályozása poszt-transzkripcionálisan zajlik. Az izoflavon-reduktáz típusú fehérjék termelődése túlnyomórészt öntermékenyülő kapcsolatban jelentkezett. Az izoflavon-reduktáz (IFR) az izoflavonoid fitoalexinek termelésében vesz részt, amelyek kórokozók támadása következtében halmozódnak fel (Lers és mtsai., 1998). Izoflavonoidok nem termelődnek a *Solanaceae* család növényeiben, és valószínűleg a kajszi genomjában sem található *IFR* gén. A pollentömlő növekedése következtében kifejeződő CP100 fehérje hasonló a hüvelyesek IFR enzimfehérjéjéhez, továbbá a számos fajban (pl. kukoricában és dohányban) jelen lévő, IFR-hez hasonló NAD(P)H-oxidoreduktázokhoz (Eldik és mtsai., 1997). Az IFR típusú fehérjék nem rendelkeznek *in vitro* izoflavon-reduktáz enzimaktivitással. Az izoflavon-reduktáz típusú fehérjék szerepe még ismeretlen a kajszi bibéjében lejátszódó kompatibilis reakciók során. Az *S*-lókusztól független *M* lókusz a *Brassicaceae* család önmeddőségével kapcsolatos jelátvitelben játszik szerepet, és egy membránhoz kötött citoplazmatikus szerin/treonin protein-kinázt (MLPK) kódol (Murase és mtsai., 2004). A feltételezett Ser/Thr-kináz nagymértékű expressziója önmeddő kajszi bibéiben már az önmegporzást követő 24 óra elteltével jelentkezik (Feng és

mtsai., 2009), de a csonthéjas gyümölcsfák önmeddőségében betöltött biokémiai szerepének tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

A meglehetősen kevés tanulmányból arra következtethetünk, hogy bizonyos fehérjék kifejeződése szignifikánsan eltér öntermékenyülő és önmeddő kapcsolat esetén. Mindez alapul szolgálhat eddig ismeretlen bibefehérjék kereséséhez. Érdekes módon a proteomikai vizsgálatok némi hasonlóságot mutatnak az eltérő molekuláris háttérű önmeddőségi rendszerek között (*Brassicaceae*, *Papaveraceae* és *Rosaceae*). Bár mindez érthető, ha figyelembe vesszük, hogy az inkompatibilitási reakció végeredménye a pollentömlő dezorganizációja. Az öntermékenyülő és önmeddő kapcsolat során különbözőképpen kifejeződő bibefehérjék biológiai szerepének azonosítása segíthet az önmeddő gyümölcsfák pollen–bibe kölcsönhatások háttérében álló molekuláris mechanizmusok tisztázásában. A mechanizmus teljes megértéséhez a mindezidáig ismeretlen metabolomikai háttér feltárása is nagymértékben hozzájárulhat, amely vizsgálatára az LC-MS alapú metabolomikai vizsgálatok jó alternatívaként szolgálnak.

2.3.4 Az önmeddőség mezőgazdasági jelentősége

A gyümölcsfajok esetében az evolúció során kialakult önmegtermékenyítést gátló mechanizmus célja és a gyümölcstermesztők gazdasági érdekei „sajnos” éppen ellentétesek. A GSI rendszer azért alakult ki, hogy fenntartsa a biológiai diverzitást, a termesztőknek azonban ez sok esetben a terméshozam fokozásának útjában áll. Az ő érdekük a lehető legnagyobb terméshozam és legjobb piaci értékű gyümölcs előállítás, ami sokszor csak úgy érhető el, ha a termesztett fajta beporzására egy másik fajtát telepítenek az ültetvénybe, amely biztosítja a kereszt-beporzást (Goldway és mtsai., 2012).

A kereszt-beporzáshoz használt fajta kiválasztására is hangsúlyt kell azonban fektetni. A semi-kompatibilis fajták ($S_a S_b \times S_a S_c$) alkalmazása bizonyos esetekben nem biztosított megfelelő terméshozamot, hiszen e fajták haploid pollenszemeinek 50%-a a megporzandó fajta bibéjében ($S_a S_b$) is megtalálható S -allél egyikét hordozza (S_a), ezáltal az összes pollennek csak a fele (S_c) lesz képes tömlőt hajtani. Ilyen esetekben teljesen kompatibilis fajták telepítése szükséges, ahol bármelyik S -allélt hordozó pollenszem képes a bibe megtermékenyítésére, pl. almánál ‘Topred’ \times ‘Jonathan’ helyett ‘Topred’ \times ‘Golden Delicious’ (Goldway és mtsai., 1999).

A teljesen kompatibilis fajták alkalmazása nemcsak a hozam, hanem a gyümölcsök mérete, ebből következően minősége szempontjából is szükséges. A körték virágaiban 10 petesejt található, melyek közül minél több termékenyül meg és fejlődik belőle mag, annál nagyobb lesz a gyümölcs. ‘Spadona’ körtefajta vizsgálata során Goldway és mtsai. (2012) megállapítása szerint minden egyes mag 1-2 mm-rel növeli meg a gyümölcs átmérőjét.

A *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfajok többsége önmeddő, de néhány önmeddő faj esetében öntermékenyülő természetű fajták is ismertek (pl. kajszi, cseresznye, mandula). Mivel a fajok nagy részénél a fajták túlnyomó többsége önmeddő, mindenképp szükséges a keresztbeporzásra szolgáló fajták telepítése, amíg nem állnak rendelkezésre olyan fajták, melyeknél a megfelelő gyümölcsminőséghez az öntermékenyülés képessége is társul. Másik alternatíva az önmeddőség háttérben álló folyamatok feltérképezése és a mechanizmus esetleges befolyásolása. Ennek érdekében mindezidáig DNS és fehérje alapú vizsgálatokat végeztek, ugyanakkor a folyamat teljes körű tisztázása még várat magára. Ehhez egy új megközelítés, a metabolomika által azonosítható vegyületek vizsgálata is adhat értékes információt.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Első célkitűzés:

Az emberi emésztőrendszer egyik gyakori baktériuma, a *Lactobacillus casei* és egy világszerte széles körben alkalmazott peszticid, a fenhexamid kölcsönhatását vizsgáltam *in-vitro*. Céloom volt egy olyan módszer kidolgozása, amely segítségével a klór-tartalmú metabolitok szoftveresen felismerhetők. További céloom volt a baktérium és fenhexamid kölcsönhatásából keletkező klór-tartalmú xenobiotikumok felismerése és azonosítása.

Második célkitűzés:

A *Rosaceae* családba tartozó egyik gyümölcsfaj, a kajszli (*Prunus armeniaca*) önmeddőségét vizsgáltam metabolomikai ujjlenyomatkészítés segítségével. Az önmeddőségi reakciók lefolyása nem teljesen tisztázott, ennek értelmében kitűzött céljaim a következők voltak:

- LC-MS alapú metabolomikai ujjlenyomatkészítéssel követtem nyomon az önmeddő és öntermékeny kajszivirágok bibéjében az önmegporzást követően lejátszódó folyamatokat. E típusú metabolomikai ujjlenyomatkészítéssel céloom a genotípus és megporzási idő szerint eltérő csoportok statisztikai alapú megkülönböztetése volt.

- Az öntermékeny és önmeddő csoportok megkülönböztetéséért felelős biomarkereket kerestem, amelyek felderítését követően azok azonosítása volt a céloom.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

A felhasznált LC-MS készülék (beleértve az alkalmazott HPLC állófázist is) a szoftver, a nem célzott kereső Molecular Feature Extraction (MFE) algoritmus és beállításai mind megegyeztek a *Lactobacillus* és kajszi minták vizsgálata esetén.

4.1 Felhasznált vegyszerek

A fenhexamidot és további 16 klór-tartalmú peszticid standardot (acetamiprid, boscalid, dichlorvos, difenoconazole, epoxiconazole, fenbuconazole, haloxyfop, imazalil, linuron, metconazole, prochloraz, pyraclostrobin, tebuconazole, tetraconazole és thiacloprid), valamint a mirisztinsav dietanolamid standardot és hangyasavat a Sigma-Aldrich csoporttól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A penconazole standardet a Dr. Ehrenstorfer GmbH-től (Augsburg, Németország) szereztük be. A HPLC gradient tisztaságú acetonitril (ACN) és etanol a Fisher Scientific-től (VWR, Radnor, PA, USA) származott. Az ioncserélt víz (>18 MΩ cm) előállítására egy Millipore Milli-Q (Bedford, USA) rendszer állt rendelkezésre.

A fenhexamid-*O*-glükozid standardot (> 98% tisztaság; CAS szám: 1392231-43-4) egyedi szintézis során került előállításra a (Polgár és mtsai., 2012) tanulmányában leírtak szerint. A fenhexamid törzsoldatokat (kb. 4000 mg/l) etanolban oldottam fel és a vizsgálat kezdetéig -20°C-on tároltam. A Peloruside A standardhoz Peter Northcote (Victoria University of Wellington, Wellington, Új-Zéland) munkacsoportja által jutottunk hozzá, mely standard vegyületet tengeri *Mycale hentscheli* szivacsokból nyerték ki kromatográfiás tisztítás útján. A kémiai szintézis során nyert Peloruside A standardot pedig Dan Sackettnek köszönhetjük (Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, USA). A kapott 10 µg tömegű standardokból 100 µg/ml-es oldatot készítettem etanollal, mely oldatokat -20°C-on tároltuk a kísérletek elvégzéséig.

4.2 HPLC-ESI-QTOF MS kapcsolt rendszer

A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz Agilent 1100 típusú bináris HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) készüléket alkalmaztam. Állófázisként fordított fázisú Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 µm, 2,1 mm x 50 mm; Agilent) oszlopot használtam. A választásom azért esett erre az oszlopra, mert a 3,5 µm-es szemcseátmérő és a 2,1 mm-es belső átmérő nagy kromatográfiás felbontást biztosítanak, miközben a biológiai minták általi bonyolult mátrixokra sem kényesek, ezáltal az oszlop ritkán tömődik el és kellően robusztus.

Kísérleteim során Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) típusú készüléket alkalmaztam. A folyadékkromatográfiás rendszer és a tömegspektrométer összekapcsolása elektroporlasztásos ionforrás (ESI), úgynevezett Dual-spray

ionforrással történt. Ebben az ionforrásban két porlasztótű helyezkedik el, melyek közül az egyik csak a HPLC-ből érkező térfogatáram porlasztását végzi, a másik porlasztótű pedig az állandó tömegkorrekcióhoz szükséges referenciaoldat porlasztására szolgál. Az alkalmazott referenciaoldatok a gyártó ajánlásai szerint készültek, a bennük található purin ($C_5H_5N_4$, $(M+H)^+$ m/z 121,050873, $(M-H)^-$ m/z 119,036320) és HP-0921 ($C_{18}H_{19}O_6N_3P_3F_{24}$ $(M+H)^+$ m/z 922,009798, $(M + HCOO)^-$ m/z 966,000725) komponensek m/z értéke alapján, automatikusan történt a tömegkorrekció. A készülék tömegpontossága 3 ppm alatti volt, tömegfelbontása pedig >10000 (FWHM) m/z 400 értéknél, amit a későbbiekben bemutatottak szerint ellenőriztem.

A minták vizsgálata először MS^1 módban történt, majd ahol a (differenciáló) komponensek azonosítására volt szükség, azt az úgynevezett Auto MS/MS módban hajtottam végre.

Mind az *L. casei* által előállított fenhexamid eredetű xenobiotikumok keresése, mind a kajszii gyümölcsfák metabolomikai vizsgálata (5.1 és 5.2 fejezet) során ugyanazt a készülékpárosítást használtam. A fordított fázisú elválasztás során gradiens elúciót vettem igénybe a már említett RP C18-as állófázis segítségével. A tömegspektrométer beállításai és a kiválasztott adatrögzítési módok is megegyeztek, illetve mindkét esetben MS^1 módú detektálást alkalmaztam, majd miután szoftveres eljárással kiszűrtem a differenciáló komponenseket, Auto MS/MS módban történt azok fragmentációja. A tömegspektrumot MS^1 módban m/z 100-1700 tartományban, MS^2 módban pedig m/z 50-1700 tartományban rögzítettem. A készülék beállításait a **3. táblázatban** foglaltam össze.

Auto MS/MS módban a prekursor ionoknak egy előzetesen beállított minimális ionintenzitás értékkel kell rendelkezniük, esetemben ezt előzetes tapasztalatok alapján 5×10^3 -os értékre állítottam be. Annak érdekében, hogy a differenciáló komponensek mindenképp fragmentálásra kerüljenek - akkor is ha nem ezek a legintenzívebbek az adott retenciós időnél – a molekulaionjaik monoizotópos tömegeit ún. preferált tömegszámként állítottam be. Továbbá az MS^2 kísérletek során azért vettem kisebbre az adatgyűjtési gyakoriságot, mert egységnyi ideig tartó adatgyűjtési ciklus alatt kevesebb spektrum rögzítése az egy spektrum felvételére szánt időt növeli meg. A nagyobb adatgyűjtési idő több tranziens összegyűjtésével jár (4440 helyett 5354 tranziens), ami nagyobb érzékenységet eredményez, így az ionok intenzitása megnő, azonban a tömegpontosság csökkenését is magával vonja, így csak kismértékű módosítást hajtottam végre.

3. táblázat: A QTOF készülék beállításai MS¹ és MS² módban.

Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS	
ionforrás típusa	Dual ESI (Agilent)
működési mód	pozitív/negatív
prekurzor ion izolációs ablaka	„medium” (~4 m/z)
tömegpontosság	<3 ppm
tömegfelbontás	>10000
detektálási frekvencia	4 GHz
adatgyűjtési gyakoriság	MS mód: 3 spektrum/s (333 ms/spektrum, 4440 tranziens/spektrum) MS/MS mód: 2,5 spektrum/s (400 ms/spektrum, 5354 tranziens/spektrum)
ütközési energia	5 eV/100Da + 10 eV
prekurzor minimum intenzitása	5x10 ³ counts
maximum prekurzorok száma ciklusonként	2
porlasztógáz hőmérséklete	325 °C
szárítógáz	10 L/perc
porlasztógáz nyomása	40 psig
fragmentor feszültség	175 V/-175 V
függöny feszültség	65 V/ -65 V
kapilláris feszültség	3500 V / -3500 V
adatgyűjtő, -feldolgozó szoftver	MassHunter Acquisition B.06.00 (SP3) MassProfiler Professional B.02.1.5

4.3 Adatfeldolgozás - Nem célzott komponenskeresés

Az esetben használt Agilent MassHunter Qualitative Analysis szoftverben a nem célzott kereső algoritmus neve MFE, mely nagyvonalakban a következőképp működik:

1. Extrahált ionkromatogramokat (EIC) készít, hogy a tömegszámok időbeli lefutását végig lehessen követni.
2. Az EIC-ket összehasonlítja és az azonos időbeli lefutású ionokat megpróbálja összetársítani, hiszen ha jó az egyezés, akkor a különböző tömegszámok jó eséllyel ugyanahhoz a molekulaionhoz tartoznak.
3. Ha a korreláló EIC-k közötti tömegkülönbségek automatikusan (ismert törvényszerűség alapján) vagy egyéni módosításból fakadóan megmagyarázhatók, akkor ugyanazon komponenshez társítja őket. Ez azt jelenti, hogy az MFE szerint egy „feature” egy adott komponenshez tartozó $t_R - m/z$ adatpáros (egy t_R értékhez több m/z érték társul). Ilyen megmagyarázható különbségek lehetnek: izotopológok, adduktok (+Na⁺: 22,9898 Da, +K⁺:

38,9637 Da, +NH₄⁺: 18,0344 Da, +Cl⁻: 34,9689 Da stb.), semleges veszteségek (-H₂O: 18,0106 Da, -CH₂: 14,0157 Da).

4. Az összetársított komponenseket felsorakoztatja és komponenslistát alkot. Ez utóbbinak azért van szerepe, mert a szoftver így tudja összevonni a különböző futtatások között az azonos retenciós időnél jelentkező, azonos monoizotópos tömegű „feature”-ket (felhasználó által beállított tolerancia értékeken belül), ami alapján később a statisztikai különbségtétel is történik.

A komponenslista természetesen minden egyes mérési fájlban eltérő. A nagy komponensszám és a komplex biológiai mátrix miatt az injektálási párhuzamosok között is természetes jelenség az eltérés, a szoftveres kiértékelés természetes velejárója a pozitív és negatív téves találatok megléte. Mindenképp figyelembe kell venni tehát, hogy a szoftverek teljesítménye és megbízhatósága erősen változó. Sok szoftveres probléma merülhet fel, melyek mind a szoftveres kiértékelés megbízhatóságát és reprodukálhatóságát kérdőjelezzik meg. A szoftverek teljesítményére nagy befolyást gyakorol annak verziója és a gyártók által a hibák javítására kiadott upgradek megléte. A képet és a metabolom lefedettségét a méréstechnika általi limitációkon felül tehát a kiértékelés minősége is befolyásolja, azonban a felhasználói beállítások módosításával ez nagymértékben finomítható. Ezen felül a készülék gyártója által ajánlott ún. „rekurzív” munkamenetet használtam, mely használatát egy, a gyártó által készített leírásban ismertem meg (Kitagawa és mtsai., 2009).

4.4 *Lactobacillus casei* által termelt fenhexamid eredetű klór-tartalmú xenobiotikumok metabolomikai feltérképezése

4.4.1 Sejttenyészetek elkészítése

Az *L. casei* Shirota törzstenyészetek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származnak (NCAIM, Budapest). A sejttenyésztést a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékén, míg az analitikai feladatokat az Alkalmazott Kémia Tanszékén hajtottam végre. A hagyományos MRS ferde agaron tartott sejteket a kísérletek elvégzése előtt, az állományok megfelelő frissességének elérése érdekében a folyékony tápközegbe való átoltásuk után két napos lépésközökkel, 100 µl mennyiségekkel oltottam át 20 ml, 20 g/l D-glükóz tartalmú MRS tápközegbe (Himedia M369-500G; Himedialabs, Mumbai, India) összesen öt alkalommal, 37 °C hőmérsékleten.

A fenhexamid törzsoldatot 0,45 µm pórusátmérőjű eldobható PTFE fecskendőszűrőkön keresztül szűrtem le; mely koncentrációja 4000 µg/ml volt. 25, 200 és 500 µl törzsoldat felhasználásával három különböző, 5, 40 és 100 µg/ml fenhexamid koncentrációjú tenyészetet készítettem, melyeket 20 ml-es végső térfogatra egészítettem ki. Mindegyik tenyészet végső

etanol koncentrációja 2,5 % (v/v) volt. A sejtek tenyésztése 72 óráig folyt 37 °C-on, ezeken a mintákon felül pedig sejtmentes kontroll minták is készültek, melyek 100 µg/ml fenhexamidot tartalmaztak ugyancsak 2,5 % (v/v) etanol-tartalmú MRS tápközegben.

4.4.2 Mintaelőkészítés

A minták begyűjtése a fermentáció elindítása után 24, 48 és 72 órával történt, mely mintákat 2 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttem. Ezután a sejteket 10.000 g-s terheléssel, 4 °C-on történő centrifugálás útján választottam el a felülúszótól egy Hettich Mikro 22R (Tuttlingen, Németország) típusú laborcentrifuga segítségével. A mintákat 10-szeres térfogatra hígítottam úgy, hogy az ACN végső koncentrációja 5 % (v/v) legyen. A mintákat üveg HPLC mintatartó edényzetbe pipettáztam, 0,45 µm pórusátmérőjű PTFE fecskendő szűrővel szűrtem, majd injektáltam az LC-MS rendszerbe.

A kezdeti 20-20 ml mintákból így csak 6-6 ml fogyott és a maradék, kb. 14 ml-t -20 °C-on tároltam a szilárd fázisú extrakciós (SPE) kísérletek lefolytatásáig. Az SPE kísérletekhez Waters Sep-PaK® Vac C18 3 ml-es fecskendőbe integrált eldobható tölteteket (Waters, Milford, MA, USA) használtam, melyeket Thermo Scientific Hypersep 16 férőhelyes SPE vákuumrendszerrel dolgoztam fel (Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA).

A C18-as fordított fázisú töltet nedvesítése és kondicionálása után történt a minták felvitele. Fordított fázisú C18-as típusú SPE töltetknél ügyelni kell arra, hogy 100% poláris közeggel ne találkozzon, ugyanis az erősen hidrofób oktadecil csoportok összezsugorodhatnak, elveszthetik aktivitásukat, ezáltal a tölteten a komponenseknek nem lesz megfelelő visszatartása és így a komponensek nem kötődnek meg rajta. Ennek érdekében az 5 ml vizes felülúszóhoz 1 ml ACN-t pipettáztam, amely kb. 16,7 % -os (v/v) ACN koncentrációt eredményezett. További szempont, hogy a töltetet ne terheljük túl, ökölszabály, hogy 100 mg töltet 1 mg célkomponens megkötésére képes. A mosási lépés során 3 ml 30 %-os (v/v) ACN:ioncserélt víz elegyet alkalmaztam, mert fenhexamid eredetű anyagcseretermékek esetében a megmaradó hidroxifenil gyűrű miatt nem számítottam poláris metabolitokra (Abbate és mtsai., 2007; Anderson és mtsai., 1999; Cabras és mtsai., 2004; FAO, 2005), amelyek ilyen ACN koncentrációjú eleggyel lemosódnak a töltetről. Az eluálás végül 2 ml 80 %-os (v/v) ACN:ioncserélt víz eleggyel történt. Az SPE során alkalmazott lépéseket a **4. táblázatban** foglaltam össze. Végül a 2 ml-el eluált mintát Eppendorf csöbe gyűjtöttem össze és argon gázáram alatt szárazra pároltam, majd pedig 200 µl 20 % (v/v) ACN:ioncserélt víz eleggyben oldottam fel újra, hogy 25-szörös töményítést érjek el. Mivel azonban az Eppendorf cső falán szemmel láthatóan maradt vissza nem oldott

szárazanyag, így a visszaoldás térfogatát 400 µl-re módosítottam. Az így elkészített mintát végül 0,45 µm pórusméretű PTFE fecskendőszűrővel szűrtem, majd injektáltam az LC-MS rendszerbe.

4. táblázat: SPE dúsítás lépései.

SPE lépései	Oldószer
nedvesítés	5 ml ACN
kondicionálás	10 ml, ACN:H ₂ O 5:1 (v/v)
mintafelvitel/extrakció	6 ml, felülúszó:ACN 5:1 (v/v)
mosás	3 ml, ACN:H ₂ O 3:7 (v/v)
eluálás	2 ml, ACN:H ₂ O 8:2 (v/v)

4.4.3 HPLC paraméterek

A HPLC elválasztás térfogatára 400 µl/perc volt, gradiens elúció során vizes eluensként 0,1 % (v/v) hangyasav tartalmú ioncserélt vizet (A eluens), szerves eluensként pedig 0,1 % (v/v) hangyasav tartalmú acetonitrilt (B eluens) használtam. A gradiens elúció programja az **5. táblázatban** látható. A hangyasavat azért tartottam szükségesnek, mert elősegíti a komponensek ionizációját pozitív ionizációs módban, valamint a trifluor-ecetsav (TFA), ecetsav és egyéb illékony pufferekhez, additívokhoz képest negatív módban kis molekulatömege miatt kevés interferenciát okoz a célkomponensekkel, valamint nem szennyezi a készüléket, így az érzékenységét sem befolyásolja. Az említett okok miatt más puffer- illetve additív-tartalmú eluens nem próbáltam ki.

5. táblázat: Gradiens elúció programja.

Futtatási idő, perc	B eluens
0-3 perc	10 %
3-15 perc	100 %-ra
15-17 perc	100 %
17-18 perc	10 %-ra
18-22 perc	10%

4.4.4 Differenciáló komponensek meghatározása

A MassHunter Qualitative Analysis segítségével végrehajtott MFE komponenskeresés és összegképlet generálás után a statisztikai alapú különbségtételre a MassProfiler Professional (Agilent, B.02.1.5) szoftvert használtam. A komponensek közül a klór-tartalmú komponensekre fókuszáltam, amelyek közül a kontroll és a kísérleti minták összehasonlításával szűrtem ki a megkülönböztető komponenseket a következő módszerek segítségével: csoporton belüli gyakoriság vizsgálat, t-próba az intenzitásértékek középértékeinek összehasonlítására és intenzitások hányadosainak meghatározása. Ez utóbbi sokkal erősebb szűrési paraméter, mint a t-

próba, ugyanakkor vizsgálataim során jogosult voltam a használatára, hiszen a kontroll mintába nem kerülhettek fenhexamid metabolitok, így azok jellemzően nagy intenzitásbeli eltérést mutattak a két csoport között.

A MassProfilerben a paraméterek beállítása után már csak a differenciáló komponenseket listázta a szoftver, ezeket vizsgáltam felül manuálisan.

4.4.5 Komponensazonosítás

A differenciáló komponensek megtalálása az azonosítás standard vegyület segítségével történt, amelyet ugyanabba a rendszerbe injektáltam és retenciós idejét, MS^1 és MS^2 tömegspektrumát hasonlítottam össze a keresett komponensével.

4.5 Kajszi önmeddőségének metabolomikai ujjlenyomatkészítése

4.5.1 Növényi minták gyűjtése

A kísérletek lefolytatásához két kajszifajtát választottam: az önmeddő ‘Ceglédi óriást’ (S_8S_9) és az öntermékenyülő ‘Pannóniát’ ($S_C S_C$). A minták begyűjtése 2011 májusában a Budapesti Corvinus Egyetem szigetcsépi tanültetvényében zajlott, amikor a kajszi fák rügyei még az ún. pirosbimbós állapotban voltak. A pirosbimbós állapotbeli gyűjtés azért volt mindenképp szükséges, mert ebben a fejlettségi állapotban a virágok még teljesen zárt állapotban vannak és a bennük található portokok sem nyílnak még fel, így a bibékre sem külső, sem pedig belső forrásból nem kerülhetnek pollenszemek.

A fákról először ágakat gyűjtöttem, melyeken viszonylag nagyszámú bimbó volt található, és laboratóriumba szállításuk után csapvízzel teli tárolóedényekbe állítottam őket. A laboratóriumban a bimbókat kasztráltam, azaz eltávolítottam a porzókat és csak a bibéket hagytam az ágakon, mely bibék nagy részét az eltávolított, saját porzóikból kipergetéssel nyert pollennel irányítottan poroztam be. Az általam vizsgált virágok kasztrálás előtt és után a **7. ábrán** láthatóak.



7. ábra: A kajszivirágok pirosbimbós állapota, és a begyűjtést követő kasztrált virágok után megmaradt bibék. A vizsgálatokhoz felhasznált mintarészt a piros keret jelöli.

Mindkét fajta esetében beporzás nélküli bibéket is gyűjtöttem, majd a többi bibét 3, 24 és 96 órával az irányított beporzást követően szedtem le, mellyel az volt a célom, hogy a pollentömlők fejlődését időben is követni lehessen. A minták jelölését az **6. táblázatban** foglaltam össze.

6. táblázat: Kajszi bibeminták jelölése.

Genotípus	Megporzás után eltelt idő			
	0 óra	3 óra	24 óra	96 óra
Ceglédi óriás	CÓ, 0h	CÓ, 3h	CÓ, 24h	CÓ, 96h
Pannónia	Pannónia, 0h	Pannónia, 3h	Pannónia, 24h	Pannónia, 96h

A minták leszedését követően a bibéket azonnal folyékony N₂-be helyeztem, hogy megszakítsak minden anyagcsere-folyamatot, majd genotípus, illetve megporzás utáni időtartamok szerint megkülönböztetve, kb. 1-1,5 g-os adagonként -80 °C-os fagyasztóba helyeztem őket a kísérletek elvégzéséig.

4.5.2 Minta-előkészítés

Az általam alkalmazott minta-előkészítés a t'Kindt és mtsai tanulmányában leírtakat követi, ugyanis az alább részletezett minta-előkészítési eljárást találták optimálisnak növényi minták esetében (t' Kindt és mtsai., 2008).

A bibéket a fagyasztóból kivéve azonnal dörzsmozsarakban lévő folyékony nitrogénbe helyeztem, hogy megakadályozzam, illetve minimálisra csökkentsem az oxidáció és egyéb bomlási folyamat lehetőségét. A bibéket ezután porrá aprítottam a dörzsmozsárban egy pisztillus segítségével és a kapott porból analitikai mérleggel 100 ± 1 mg-os adagokat mértem ki 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe. Mindegyik fajta minden egyes csoportjából három biológiai párhuzamot készítettem, így összesen 24 különböző minta állt rendelkezésre. Az így elkészített mintákhoz aztán 990 µl 80:20 % (v/v) metanol:ioncserélt víz elegyet adtam extrahálószerként és 10 µl belső standard oldatot (10 ng/ml koncentrációjú tebuconazol ACN-ben). Az extrakciót alapos vortexelés és 15 percig tartó, 25°C-ra temperált rázógéppben (Ditabis/HLC MKR 13, Pforzheim, Németország) való rázatás segítségével hajtottam végre.

Az extrakciót követően az oldhatatlan növényi szöveteket 10.000 g-s terhelésen, 4°C-on, 10 percig tartó centrifugálással (Hettich Mikro 22R centrifuga, Tuttlingen, Németország) választottam el az extraktumtól. A dekantált felülúszókat ioncserélt vízzel 10-szeresére hígítottam, majd 0,45 µm porúsátmérőjű fecskendő szűrőkkel való szűrés után injektáltam az LC-MS rendszerbe.

4.5.3 HPLC paraméterek

Az elválasztás során alkalmazott gradiens elúció térfogatarama 400 µl/perc volt, az injektált mintatérfogat 10 µl, vizes eluensként 0,1 % (v/v) hangyasav tartalmú ioncserélt vizet (A eluens),

szerves eluensként pedig 0,1 % (v/v) hangyasav tartalmú acetonnitrilt (B eluens) használtam, a gradiens elúció programja a **5. táblázatban** látható.

4.5.4 Differenciáló komponensek meghatározása

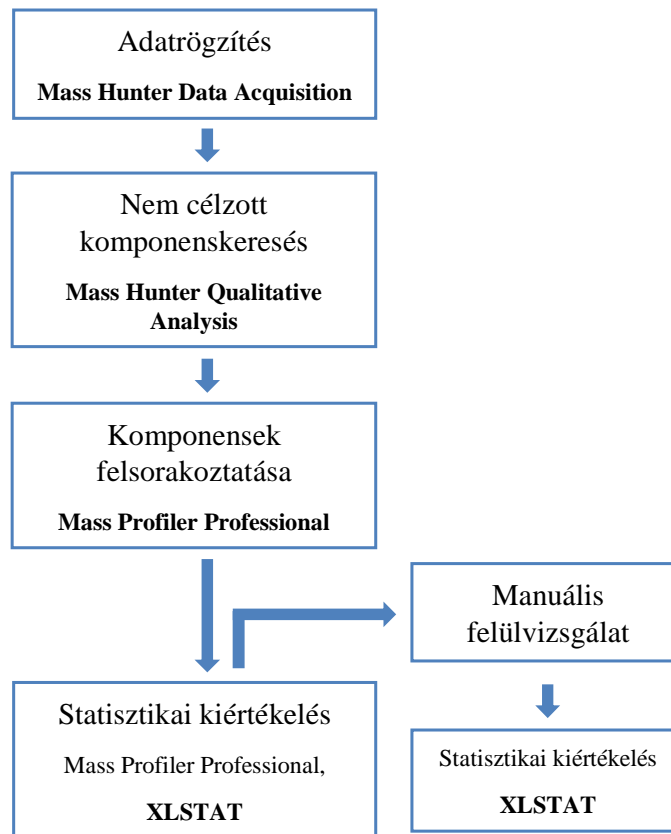
A nem célzott komponenskereső MFE algoritmus lefuttatása után statisztikai alapon szűrtem ki azokat a komponenseket, melyek szignifikáns szerepet játszanak az önmeddősegi fenotípus kialakulásában. E célra két szoftvert használtam: a MassProfiler Professionalt (MPP) és a Microsoft Excel „add-in”-jaként működő XLSTAT-ot (Addinsoft, USA, 2013.1 kiadás).

A komponens elrendezés és a komponenslista megalkotásában (felsorakoztatás, compound alignment) szempontjából nagyon hasznosnak bizonyult az MPP, azonban megjelenítés és kezelés szempontjából több gyakorlati hátránnyal is bír az XLSTAT-hoz képest. Ebből kifolyólag a komponens felsorakoztatás csupán MPP-vel történt, majd az így kapott komponenslista alapján mind MPP-vel, mind pedig XLSTAT-tal végrehajtottam a statisztikai alapú különbségtételt. A megkülönböztető komponensek meghatározásának menete a **8. ábrán** látható.

A statisztikai különbségtétel során a következő módszereket alkalmaztam: 1, csoportokon belüli gyakoriságvizsgálat, 2, intenzitásértékek időbeli monotonitásvizsgálata, 3, t-próba, 4, végül heatmap készítése a megkülönböztető komponensek alapján és főkomponensanalízis (PCA) lefuttatása a csoportok egymástól való megkülönböztetésének vizualizálására és a szignifikáns metabolitok meghatározására.

A következő okokból adódóan tartottam szükségesnek a két szoftver alkalmazását:

- Célszerű volt leellenőrizni, hogy a statisztikai különbségtétel eredménye megegyezik-e a két szoftver esetében, illetve
- az MPP alapvetően külön kezeli a pozitív és negatív módban talált komponenseket, és a két komponenslista összevonása szoftveren belül nem lehetséges
- főkomponens analízis (PCA) során vizuálisan nehezen lehet kideríteni (nem szemléletes), hogy a figyelembe vett metabolitok közül (loadingok) melyek a legjelentősebbek
- a komponensfelsorakoztatás után az MPP lehetőséget ad a komponensek és intenzitásértékeinek .csv (vesszővel tagolt értékfájl) formátumban történő exportálására, mely könnyen kezelhető a Microsoft Excel, illetve XLSTAT számára is.



8. ábra: A kajszimintákat megkülönböztető komponensek statisztikai kiszűrésének menete.

4.5.5 Komponensazonosítás

A differenciáló komponensek meghatározása után az első lépés az izotopológ eloszlások alapján történő összegképlet generálás volt. Monoizotópos tömeg alapján, adatbázisokban való kereséskor sokkal több a találat (vele együtt több a téves találat is), mint amikor a már meghatározott összegképlet alapján keresünk. A kapott összegképletek alapján a Dictionary of Natural Products és Scifinder adatbázisokban kerestem a komponenseket, és ahol informatív fragmensek, semlegesvesztések stb. rendelkezésre állt, azok alapján próbáltam a lehetséges komponensek számát csökkenteni. A kiválasztott találatokból végül hiteles standard anyagot próbáltam beszerezni és azonosítani a komponenseket a rendelkezésre álló standardok és mintabeli komponensek retenciója és MS^2 fragmentációjának összehasonlítása alapján.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Fehexamid eredetű xenobiotikumok keresése *Lactobacillus casei* tenyészetekben

5.1.1 *Lactobacillus casei* tenyészetek

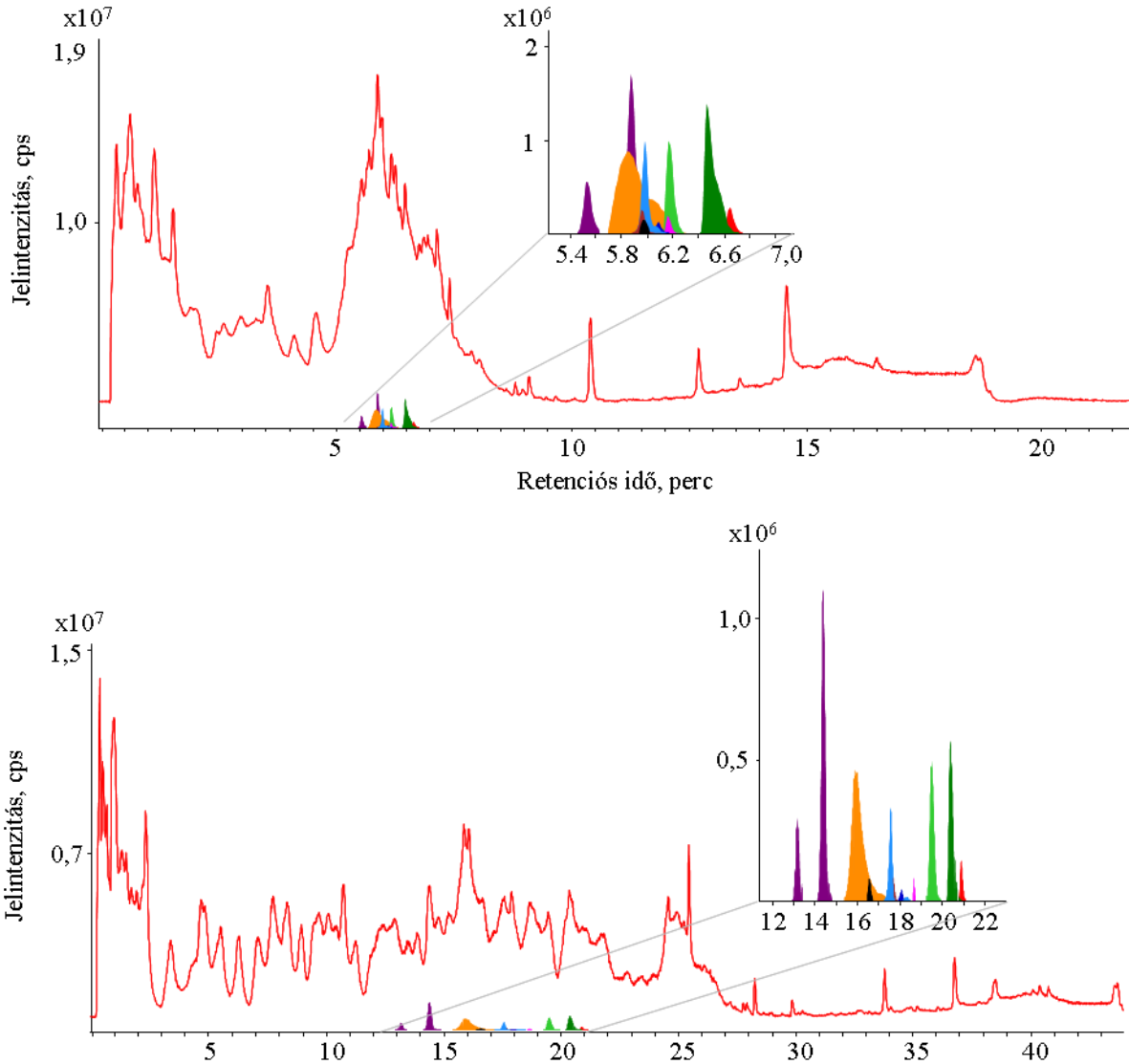
A kísérlet első lépésében három különböző koncentrációjú fehexamid oldatot készítettünk, hogy a baktériumok az általuk elviselhető legmagasabb fehexamid expozíciónak legyenek kitéve. Ez azért volt fontos, mert akkor képződnek a legnagyobb mértékben detoxikációs termékek, minél nagyobb stressz éri a sejteket, arra azonban ügyelni kellett, nehogy a túl magas koncentráció miatt elpusztuljanak a sejtek.

Arra vonatkozóan, hogy a sejtek mekkora fehexamid expozíciónak tehetők ki a sejttenyészet pusztulása nélkül, Békefi diplomadolgozatában (Békefi, 2013) végrehajtott korábbi kísérlet adott választ.

Az említett diplomadolgozat tapasztalatai szerint 20 µg/ml fehexamid koncentráció mellett a két különböző *L. casei* törzs esetében sem volt megfigyelhető sejtpusztulás, ami jó alapot adott arra, hogy ettől nagyobb 40 és 100 µg/ml-es fehexamid koncentrációt alkalmazzak. A sejttenyészetek közül egyik fehexamid koncentráció esetében sem tapasztaltam sejtpusztulást. A fehexamid 100 µg/ml-nál nagyobb koncentrációjának alkalmazását azonban már nem tartottam indokoltnak, hiszen ez az érték 2,5-szer nagyobb, mint bármelyik zöldségre vagy gyümölcsre érvényes legnagyobb MRL érték.

5.1.2 HPLC-ESI-MS paraméterek

A TIC kromatogramokon jelentkező zsúfoltság (**9. ábra**) miatt módosítottam a kezdeti gradiens elúció programját, azonban az eluensek összetevőit nem változtattam a korábban felsorolt előnyök miatt.



9. ábra: A kezdeti (a) és továbbfejlesztett gradiens (b) elúció során kapott TIC kromatogramok, és néhány kiválasztott, közel azonos retenciójú komponensek EIC kromatogramjai.

A gradiens elúció programjának változtatásával megpróbáltam csökkenteni a kezdeti gradiens 5 és 7 perces retenció idő tartományában koeluáló komponensek számát (**7. táblázat**) és a kromatográfia teljesítményét javítani. A komponensek koeluálásának csökkentése mindenképp kedvező hatást gyakorol az ESI ionizáció hatásfokára, hiszen a metabolitok nem versengenek az ionizációs energiáért, így több metabolit detektálása lehetséges (Yamashita és Fenn, 1984). Értelemszerűen, a futtatás időtartama jelentősen megnőtt, de a kromatográfiai paraméterek javultak, ahogy a **8. táblázatban** is látható. Bár nem sikerült minden

kiválasztott komponens egymástól alapvonalon elválasztani, de nem is volt feltétlenül cél, ahogy a jelen lévő több ezer egyéb komponensé sem, hiszen az adott műszerezettséggel nem lett volna megvalósítható.

Annak ellenére, hogy a félérték szélesség (FWHM) és elméleti tányérszám (N) értékek esetében túlnyomórészt az értékek romlását tapasztaltam, a kitűzött célok elérése érdekében lényegesebb volt az összes komponens esetében tapasztalható jel/zaj arány (S/N) és kromatográfiás felbontás (R_s) értékek pozitív irányú változása.

7. táblázat: A kezdeti és a továbbfejlesztett gradiens elúció programjai:

Kezdeti gradiens:

Futtatási idő, perc	B eluens
0-3 perc	10 %
3-15 perc	100 %-ra
15-17 perc	100 %
17-18 perc	10 %-ra
18-22 perc	10%

Fejlesztett gradiens:

Futtatási idő, perc	B eluens
0-3 perc	5 %
3-7 perc	5-ről 9 %-ra
7-10 perc	9 %
10-20 perc	9-ről 20 %-ra
20-22 perc	20%
20-40 perc	20-ről 100 %-ra
40-42 perc	100 %
42-43 perc	5 %-ra
43-47 perc	5 %

8. táblázat: Kiválasztott, közeli retenciójú komponensek kromatográfiás jellemzői. Az m/z értékek színei megegyeznek a **9. ábrában** található, a komponensekhez tartozó EIC kromatogramok színeivel. t_R – retenció idő, k' – megoszlási együttható, T – tailing faktor

m/z	Kezdeti gradiens							Fejlesztett gradiens						
	t_R , perc	k'	N	FWHM, perc	T	S/N	R_s	t_R , perc	k'	N	FWHM, perc	T	S/N	R_s
245,1290	5,6	27,1	42199	0,066	1,2	998	-	13,2	65,2	2109	0,215	1,5	1780	-
459,2600	5,9	28,7	3961	0,234	1,6	5574	0,85	16,0	79	1010	0,531	2,0	>10000	1,37
245,1290	6,0	28,8	57796	0,064	1,6	2908	-	14,5	71,3	35720	0,190	1,3	6206	3,99
588,3036	6,0	29,2	52523	0,065	2,1	94	0,95	16,6	82,2	49704	0,165	1,3	201	2,14
725,3821	6,1	29,3	75695	0,050	1,5	973	-	17,7	87,3	67741	0,157	0,9	1604	3,76
812,4148	6,0	29,2	86570	0,050	1,1	307	-	17,8	87,8	77150	0,163	0,8	580	0,39
668,3606	6,2	29,8	75889	0,051	1,8	141	1,34	18,1	89,7	78593	0,152	1,2	164	1,47
608,3845	6,2	30,0	134939	0,040	1,5	261	-	18,7	92,7	315327	0,082	1,2	654	4,49
508,2854	6,3	30,2	65397	0,063	1,5	365	0,82	19,6	96,8	10287	0,222	1,3	>10000	1,06
751,3667	6,5	31,7	44638	0,075	2,4	1292	2,42	20,5	101,3	46506	0,225	1,5	3969	2,37
530,2973	6,7	32,0	75518	0,055	1,6	1103	0,62	21,0	103,8	163309	0,127	1,2	1629	2,41

5.1.3 Adatbányászat

5.1.3.1 Nem célzott komponenskereső algoritmus validálása

Az algoritmus rendkívül hasznos, hiszen gyakorlatilag kiváltja a rendkívül megterhelő, manuális komponenskeresést. Hatékonyságát és megbízhatóságát azonban óvatosan kell kezelni, hiszen mint ahogy az ismert tény, mindegyik szoftver ejt hibát, típustól és forgalmazótól függetlenül. Ezért annak érdekében, hogy bizonyos szintű visszajelzést kapjak az algoritmus megbízhatóságáról, szükségesnek tartottam, hogy kipróbáljam egy általam készített, ismert komponenseket tartalmazó standard keverék oldaton. Ezáltal megbizonyosodhattam arról, hogy képes felismerni a komponensek helyes izotopológ mintázatát. Céлом az volt, hogy az algoritmus beállításainak módosításával az összes komponens megtaláljam, illetve, hogy minél kevesebb legyen a téves találatok száma.

Erre a célra egy 17 klór-tartalmú peszticidből álló standard keverék törzsoldatot készítettem, amelyet minden komponensére nézve 10 ng/ml-es koncentrációra hígítottam.

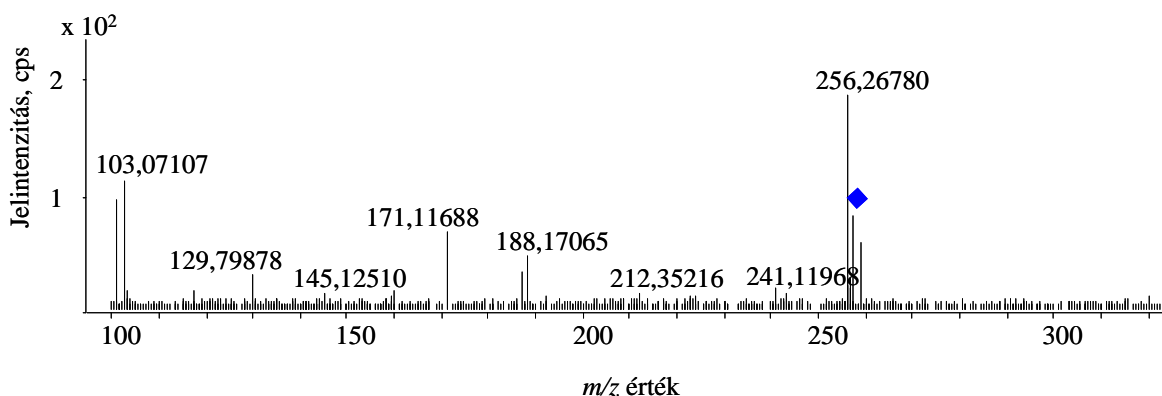
Az optimalálás során az úgynevezett „isotope spacing tolerance” érték volt a legmértékadóbb, ez az érték ugyanis az egy komponenshez tartozó izotopológok összecsoportosítására vonatkozó tolerancia értéket jelenti. Ha túl nagy ez az érték, akkor megvan a veszélye annak, hogy a valójában nem az adott komponenshez tartozó m/z értékeket is beleveszi a szoftver az izotopológok közé, ami hibás összegképlet generáláshoz vezethet. Ha viszont túl szűk ez a tolerancia érték, akkor a ténylegesen a komponenshez tartozó izotopológok esetleg kimaradhatnak az izotopológ mintázatból. Az optimalálás során az alapértelmezés szerinti 5 mDa + 7 ppm értéket végül megváltoztattam és az optimálisnak a 2 mDa + 3 ppm értéket találtam,

mert ennél az értéknél, az alapértelmezett érték 13 találatával ellentétben, az összes peszticidet megtalálta a szoftver. A jelen értéktől szigorúbb beállítások alkalmazását azért nem tartottam kézenfekvőnek, mert a QTOF készülék specifikációjából, illetve a tapasztalt tömegpontosságból kiindulva annak tömegpontossága 3 ppm alatt volt. A tényleges tömegpontosságot ugyancsak a jelenleg alkalmazott peszticidek pontos elméleti és jelen beállítások között tapasztalt tömegei alapján ellenőriztem le, mely eredményei a **9. táblázatban** találhatóak.

9. táblázat: A peszticid standard keverék törzsoldat különböző retenciós időnél eluálódó négy komponensénél tapasztalt tömegpontosság értékek.

Peszticid neve	Elméleti (M+H) ⁺	Tapasztalt (M+H) ⁺	Eltérés, ppm
Acetamiprid	223,0745	223,0744	-0,4
Imazalil	297,0556	297,0559	1,0
Epoxiconazole	330,0804	330,0807	0,9
Pyraclostrobin	388,1059	388,1051	-2,1

A másik két fontos paramétert, a minimális ion-, illetve komponens intenzitást is megnöveltem, hiszen ezáltal lecsökkent a téves pozitív találatok száma. Ez a valódi mintáknál adatvesztéshez is vezethet, azonban a 10 ng/ml koncentrációjú peszticidek során tapasztalt ionintenzitástól ($\sim 10^4$ cps) alacsonyabb intenzitású molekulák izotopológ mintázata jó eséllyel pontatlan, fragmenseképük pedig nem informatív (**10. ábra**), ezáltal azonosításuk sem lehetséges.

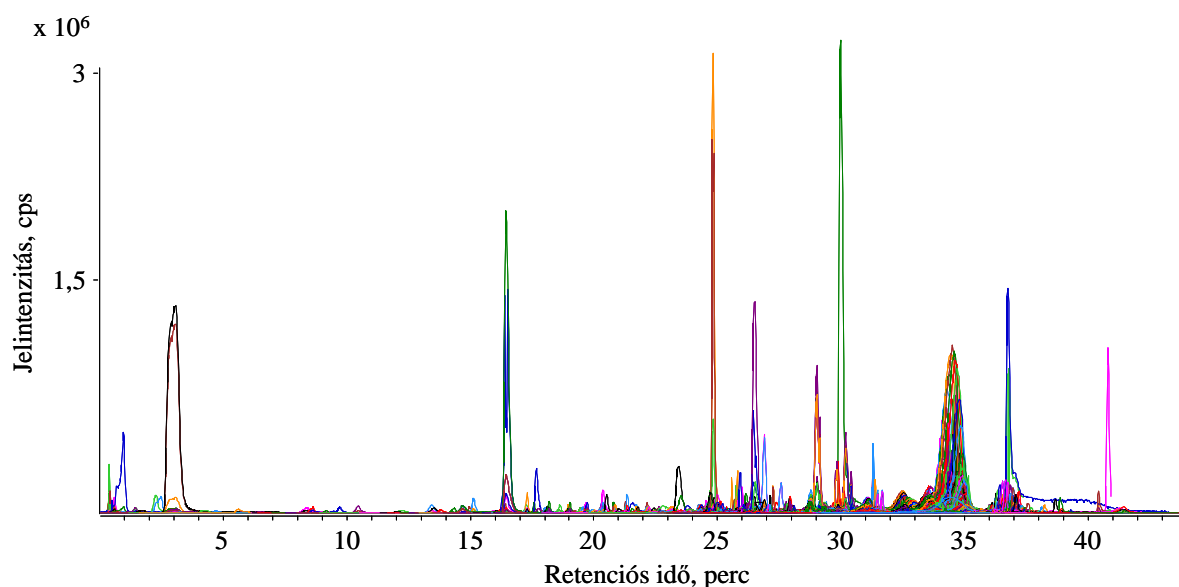


10. ábra: A 257,2472 m/z értékű ($\sim 10^4$ cps) prekursor MS^1 tömegspektruma. A kék rombusz jelzi a prekursor iont.

Ha szoftver által felkínált lehetőségek közül a keresés során figyelembe vett adduktok közül csak a protonált formákat választottam, az optimálás során túl sok volt a pozitív téves találatok száma, ezért a Na- és K-adduktok felismerésével futott az optimálás. A minták mérése során viszont úgy tapasztaltam, hogy az alapértelmezés szerinti Na- és K-adduktok figyelembe vétele sok hibás találatot eredményez, azonban ha jelen is vannak az említett adduktok, dimerek stb.,

azok emberi szemmel is könnyen észrevehetők, manuális felülvizsgálat során könnyen korrigálhatók.

Az összes találat értéke visszajelzés arra vonatkozóan, hogy mennyi téves „feature”-t talál a szoftver. Minél kisebb a téves találatok aránya, annál átláthatóbb a komponenslista. Egy dúsított *Lactobacillus casei* felülűszóban, pozitív módban talált 2986 komponens egymásra rajzolt EIC-i láthatók a **11. ábrán**. Az alapértelmezett illetve optimált beállításokat és azok eredményeit a **10. táblázatban** foglaltam össze.



11. ábra: Az összes EIC-t egymáson ábrázolva látható, milyen sok koelúció fordul elő egy természetes minta nagyszámú komponenseinek következtében.

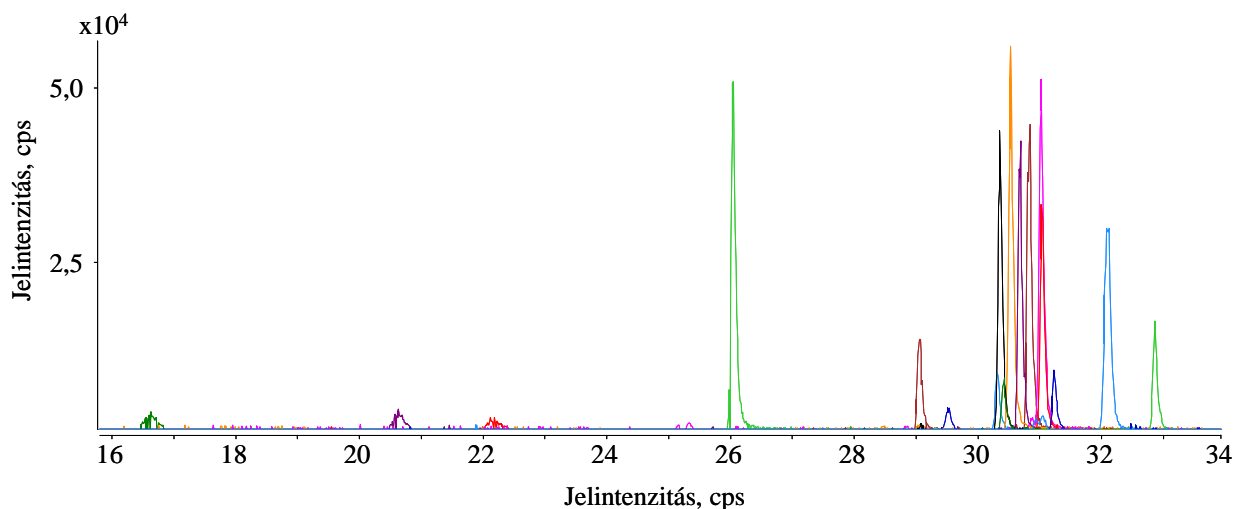
10. táblázat: MFE nem célzott algoritmus beállításai a vizsgált standard keverék törzsoldat vizsgálata esetén.

Algoritmus paraméterei	Alapbeállítás	Optimált beállítás
Isotope spacing tolerance	5 mDa + 7 ppm	2 mDa + 3 ppm
Minimum ionintenzitás	100 cps	500 cps
Minimum komponens intenzitás	2×10^3 cps	10^4 cps
Összes találat	101	34
Találatok száma	13/17	17/17
Legalább 4 izotopológgal megtalált komponensek száma	9	17

Az optimálás ellenére természetesen továbbra is hibázhat a szoftver, ami miatt a manuális felülvizsgálat és korrekció nem küszöbölhető ki, azonban a molekulák felismerésének minősége jelentősen javul.

Az algoritmus klór-tartalmú komponensek biológiai mátrixban való felismerésének bizonyítására a korábban alkalmazott peszticideket MRS tápközegbe is addicionáltam, amelyben az alkalmazott beállítások mellett ugyancsak képes volt felismerni a szoftver az összes

peszticidet a hozzájuk tartozó izotopológokkal együtt. Az így megtalált peszticidek, illetve „feature”-k EIC kromatogramjai láthatók a **12. ábrán**.



12. ábra: Az MRS tápközegbe addicionált 17 peszticid egymásra vetített EIC kromatogramja. Az algoritmus megfelelő beállításainak köszönhetően mindegyik peszticidet sikerült megtalálnia.

5.1.3.2 Klór-tartalmú metabolitok keresése

Mivel fenhexamid eredetű bomlás- illetve detoxikációs termékeket kerestem, felhasználtam a korábban már meghatározott komponensekről rendelkezésre álló információt (Abbate és mtsai., 2007; Anderson és mtsai., 1999; Cabras és mtsai., 2004; FAO, 2005), miszerint a fenhexamidban jelenlévő klór-tartalmú hidroxil-csoport nem bomlik fel, és a 2-es vagy 3-as pozícióban lévő klór atomok közül az egyik mindenképp a detoxikációs terméken marad. A fenhexamid növényi metabolizmusa során megállapított két fő metabolikus útvonal:

1. a fenol gyűrű hidroxil csoportjának konjugációja (glikoziláció), illetve
2. a ciklohexil gyűrű 2- és 4-es pozíciójában bekövetkező hidroxilációja, illetve ezt követően e hidroxil csoport konjugációja (FAO, 2005)

A klór-tartalmú metabolitok karakterisztikus izotopológ mintázattal rendelkeznek, hiszen a klórnak két jellegzetes izotópja van, ezek a Cl^{35} (75,78% relatív gyakoriság) és Cl^{37} (24,22% relatív gyakoriság). Mivel a Cl^{37} is viszonylag gyakori izotóp, ezért az A+2-es izotóp észrevehetően sokkal intenzívebb, mint a csak CHON elemekből és esetlegesen foszforból, kénből felépülő szerves molekuláké, ezért azok mind manuálisan, mind pedig szoftveresen felismerhetők. Az egyértelmű azonosítást tovább segíti, hogy a Cl^{37} -es izotóp jellegzetes 3 mDa-os tömegdefektust okoz a klór-tartalmú komponensekben az A+2 izotopológnál (Thurman és Ferrer, 2010).

A szoftveres felismertetést a következőképp valósítottam meg: az MFE segítségével nem célzottan keresett komponensek izotopológ mintázata alapján meghatároztam azok összegképletét. A szoftver által végrehajtott összegképlet generálás során kötelezően legalább

egy klór atomot írtam elő, így csak azokra a komponensekre generált jó minőségű összegképletet a szoftver, amelyek az izotopológ eloszlások alapján jó eséllyel klórt tartalmaztak. A becsült összegképleteket a MassHunter Qualitative Analysis szoftver az ún. MFG Score érték szerint rangsorolja, amelybe súlyozva beleszámítja a pontos tömeget, izotopológ arányt és az izotopológok (A, A+1, A+2 stb.) közötti tömegkülönbséget.

A 100-as maximális MFG Score értékhez legközelebbi összegképlet számít a legvalószínűbbnek, azonban minden esetben felülvizsgáltam, mert sok esetben meglehetősen kis különbség volt tapasztalható ezen score értékek között (az m/z értékek növekedésével egyre inkább) és jó eséllyel nem a legmagasabb score értékű összegképlet bizonyult helyesnek.

Ennek ellenére a feltételezett klór-tartalmú komponenseket manuálisan is ellenőriztem, ami azonban már emberi léptékű feladatnak bizonyult a lehetséges, ellenőrizendő metabolitok számottevően lecsökkent száma miatt. Miután a komponensek teljes listája elkészült, és megtörtént a minták megfelelő csoportokba sorolása, kezdődhetett a statisztikai alapú különbségtétel.

5.1.3.3 Végleges, klór-tartalmú komponensek felismerésére szolgáló algoritmus

Összefoglalva, az általam kialakított és tesztelt algoritmus beállításai a következők:

MFE nem célzott komponenskeresés:

- minimum ionintenzitás: 500 cps
 - figyelembe vett ionok: pozitív ion módban: $(M+H)^+$, negatív ion módban: $(M-H)^-$
 - isotope spacing tolerance: 2 mDa + 3 ppm
 - maximum töltöttségi állapot: 2
 - minimum komponens intenzitás: 10^4 cps
 - „quality score”: ≥ 80
 - komponenshez tartozó ionok száma: 2 vagy több
- (- megjelenítés: MFE és nyers spektrum, illetve EIC-k extrahálása)

MFG összegképlet generálás:

- felhasználható elemek: C (1-60), H (1-100), N (0-30), O (0-30), S (0-5), P (0-5), **Cl (1-3)**
- összegképlet generálás maximális semleges tömege: 750 Da
- minimum score töltéshordozónként: 35
- isotope spacing tolerance: 2 mDa + 3 ppm
- MFG score súlyzófaktorok: tömegpontosság: 100, izotopológ eloszlás: 60, izotopológok közötti tömegkülönbség: 50

5.1.4 Komponenskeresés SPE dúsítás nélkül

A kontroll és kezelt tenyészeteket először dúsítás nélkül vizsgáltam, mely során az MFE algoritmus által talált legintenzívebb komponens a fenhexamid volt, de ahogy az a **13. ábrán** található TIC kromatogramon is látható, az alapvonalbeli elválasztás nem jellemző, tehát a baktérium tápközegének vizsgálatakor erős mátrixhatással kell számolni.

Az ily módon detektált, klór-tartalmúnak feltételezett komponensek mindegyike rendelkezett a karakterisztikus, klórra jellemző izotopológ eloszlással, illetve tömegdefektus értékkel. Együttesen hat, differenciálónak vélt komponens tudtam detektálni a mintában pozitív és negatív módban. E molekulák monoizotópos tömegeinek protonált formái a következők: m/z 358,9791, 415,0412 és 471,1048 pozitív módban, illetve deprotonált tömegeik m/z 600,3902, 713,4731 és 709,3409 negatív módban, amelyek MS spektrumai a mellékletben láthatóak (M1. ábra). Manuális felülvizsgálat során azonban mind a hat komponens megtaláltam a sejtmentes mintában is, ami azt bizonyítja, hogy ezek a komponensek nem baktérium által előállított metabolitok, hanem a fenhexamid szennyezői, feltehetőleg gyártás során keletkezett melléktermékek (**11. táblázat**). Ez is egyértelmű jele volt annak, hogy a szoftver „hibázott”, nem találta meg mindegyik mintában a szóban forgó komponenseket, ami miatt a differenciáló komponensek közé sorolta őket.

11. táblázat: Az SPE dúsítás nélküli felülúszókban tévesen differenciálónak vélt komponensek m/z értékei és intenzitásértékei.

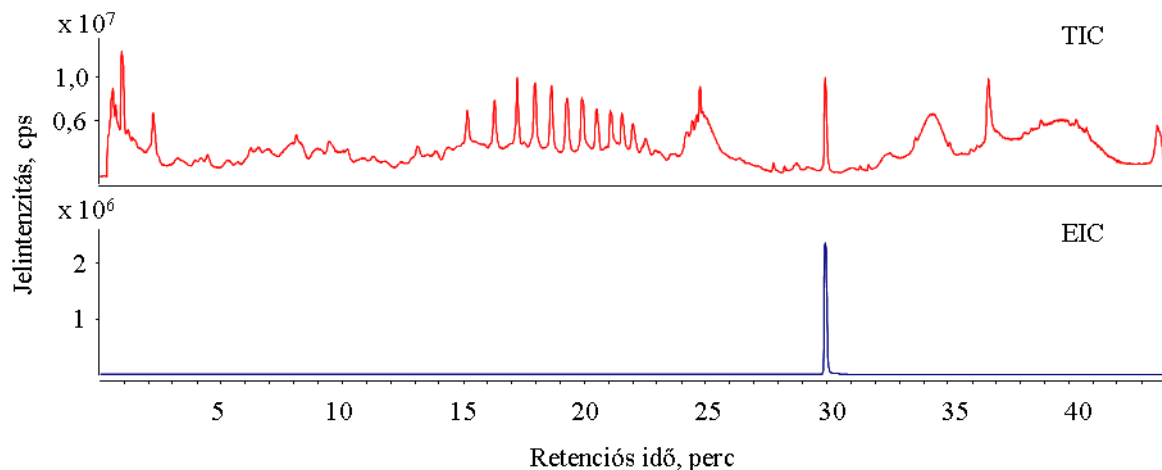
m/z érték	jelintenzitás, cps	
	kezelt	kontroll
358,9791	2879	2370
415,0412	7740	6907
471,1048	10660	11116
600,3902	12914	11793
713,4731	17521	17469
709,3409	9435	9049

Ettől függetlenül azonban megemlíthető, hogy e melléktermékeken kívül nem talált klórtartalmú metabolitokat a szoftver, tehát a keresett komponensek valószínűleg alacsonyabb koncentrációtartományban vannak jelen a sejttenyészetben. A fenhexamid melléktermékeken kívüli klór-tartalmú komponensek „hiánya” azonban nem meglepő, hiszen a természetben előforduló molekulák között egyébként is nagyon kevés klór-tartalmú található. Eltekintve a pl. erdőtüzek során keletkező, illetve lápokra, mocsarakra jellemző illékony klórvegyületektől, gyakorlatilag csak antibiotikumokban és néhány bakteriocidben található klór. A tejsavbaktériumok szerves savak, H_2O_2 , diacetil és enzimek mellett ugyancsak előállítanak bakteriocineket, de azok leginkább fehérjék (Sharma és Singh Saharan, 2014; Sikorska és

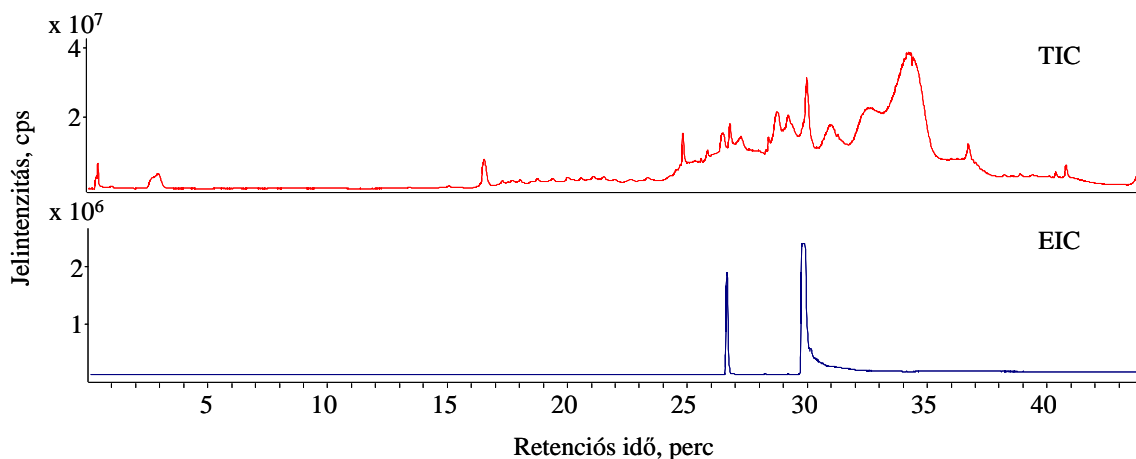
Smoragiewicz, 2013). Továbbá, ha találtam is volna nem fenhexamid eredetű klór-tartalmú komponenst a mintában, a kontroll mintával való statisztikai alapú összehasonlítás alapján mindenképpen meg tudtam volna különböztetni azokat a fenhexamid eredetűektől.

5.1.5 Komponenskeresés SPE dúsítás után

Mivel a fenhexamidon és feltételezett melléktermékein kívül nem találtam fenhexamidból származó, klór-tartalmú xenobiotikumokat, kiegészítő lépésként szilárd fázisú extrakciót alkalmaztam, hogy dúsítás során nagyobb eséllyel találjak, illetve azonosítsak klór-tartalmú metabolitokat. Mivel az összes ismert bio- és fotodegradációs termékben sértetlenül megmaradt a fenhexamid vázának klór-tartalmú, hidroxifenil gyűrűje, feltételeztem, hogy hidrofób karakterüket megtartva kellő retenciójuk lesz egy C18-as fordított fázisú tölteten, ami azt az előnyt is magában hordozta, hogy az SPE töltet vizes mosása következtében a mátrixban található sók és egyéb hidrophil makrokomponensek (cukrok stb.) lemosódnak, nem szennyezik el a kolonnát, illetve a tömegspektrométer ionforrását. Ez utóbbi hatás a **13.** és **14. ábra** ábrán látható TIC-en is látszik, miközben a nagyobb retenciójú komponensek értelemszerűen intenzívebbek lettek.



13. ábra: Az *L. casei* felülúszók pozitív módban: SPE dúsítás nélkül kapott TIC és a fenhexamid EIC kromatogramja.



14. ábra: Az *L. casei* felülúszók pozitív módban: SPE dúsítással kapott TIC és a fenhexamid EIC kromatogramja (BPC extrakciós értéke: 100 ppm).

Esetemben 5 ml mintát vittem fel a töltetre és természetesen növekedett a kromatográfias oszlopra injektált komponensek mennyisége, telítődtek az állófázis aktív kötőhelyei, ami a kromatográfias paraméterek romlását eredményezte (**12. táblázat**). A fenhexamid retenciós idejének stabilitása azonban jó visszajelzés arra, hogy a dúsított minta mennyisége nem terhelte túl a töltetet (**13. és 14. ábra**).

12. táblázat: A fenhexamid kromatográfias paramétereinek összehasonlítása SPE dúsítás előtt és után.

	t_R , perc	k'	N	FWHM, perc	Csúcs- szélesség, perc	T
dúsítás nélkül	30,0	148,7	462221	0,121	0,591	1,4
SPE dúsítás után	30,1	149,3	91667	0,234	1,301	7,1

A dúsítást követően lefutott MFE algoritmus 2986 „feature”-t talált pozitív és 1377-et negatív módban. A kötelezően legalább egy klór-atomot tartalmazó összegképlet generálás azonban jelentősen leszűkítette a keresett molekulák körét, összesen 83 ilyen komponens maradt pozitív és 47 negatív módban. Az így kapott komponenseket az összegképlet generálás jóságát jelző MFG score szerint rendeztem és a találatokat manuálisan ellenőriztem.

A pozitív módban talált megkülönböztető komponensek közül ötről feltételeztem izotopológ eloszlás, összegképlet és MFG score alapján, hogy klór-tartalmúak. A figyelembe vett paraméterek a **13. táblázatban**, tömegspektrumaik pedig a mellékletben (M2. ábra) találhatóak. A komponensek „valódi” klór-tartalmának eldöntésére a klór karakterisztikus tömegdefektus értékét, a jel/zaj arányt és tömegspektrumokat ellenőriztem. A találatok listáján látható, hogy az 5. komponens kivételével mindegyik igen kis intenzitású. Az 1., 3. és 4. komponensek esetében a különösen rossz jel/zaj arány miatt lehetetlen volt megállapítani, hogy azok izotopológ eloszlása ténylegesen klórtól származik-e. Ebben az esetben óvatosságra int az a tény is, hogy a minták már így is dúsítva lettek kb. 12,5-szeres mértékben, továbbá a QTOF készülék tömegpontosságát

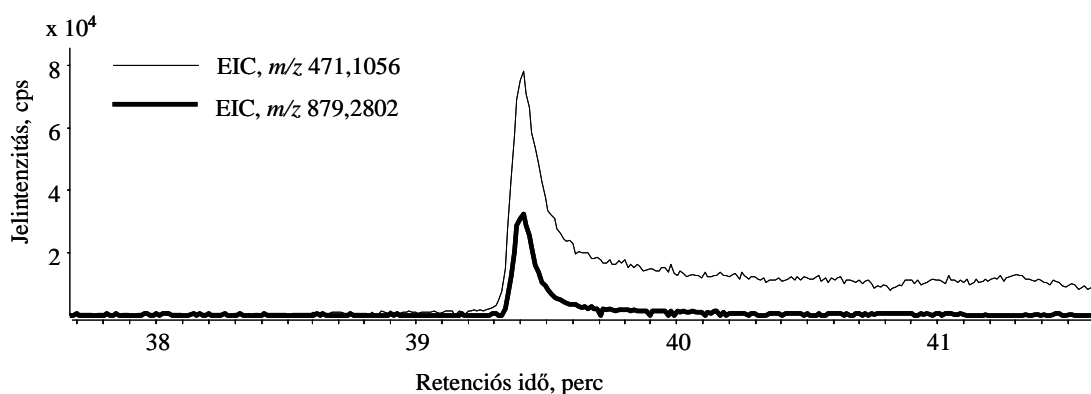
és az izotopológ eloszlás pontos meghatározását is negatívan befolyásolja a túl alacsony ionintenzitás. Ezekből kifolyólag az utóbbi három komponensről nem tudtam bebizonyítani, hogy valóban klór-tartalmú vegyületek.

13. táblázat: Az SPE dúsítás utáni felülúszókban pozitív ion módban, a szoftver által differenciálónak vélt komponensek felülvizsgált jellemzői. A komponensek az összegképlet generálásra kapott score értékek alapján vannak rendezve.

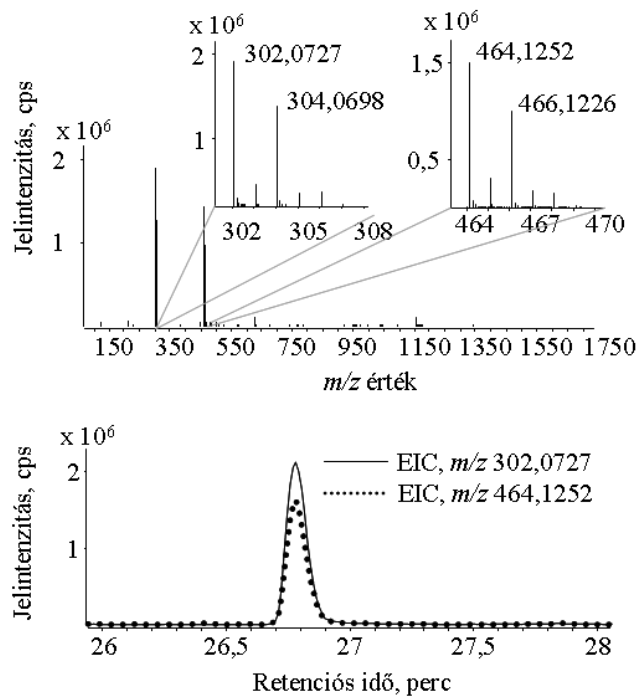
Komponens száma	MFG score	Semleges tömeg, Da	t_R , perc	Jelintenzitás, cps	Jel/zaj arány	Tömegdefektus (A+2), mDa
1. komponens	90,3	822,2097	39,5	$6,5 \times 10^3$	2,4	0,9
2. komponens	93,0	878,2724	39,4	$3,2 \times 10^4$	12,2	0,6
3. komponens	94,7	766,1465	36,2	$2,1 \times 10^4$	1,7	2,3
4. komponens*	98,6	380,0355	30,1	$6,7 \times 10^3$	0,6	3,2
5. komponens	99,1	463,1176	26,8	$1,5 \times 10^6$	102,6	2,5

* kétszeresen töltött formában jelent meg

A 2. komponens esetében azonban a tömegdefektuson kívül minden paraméter klór-tartalmú komponensre utalt, mind a jel/zaj arány, mind pedig a nagyobb ionintenzitás segített a felsimerésben. A 39,4 percnél rögzített tömegspektrum manuális felülvizsgálata során kiderült, hogy a komponens monoizotópos tömege 470,0975 Da. A komponenshez tartozó m/z értékekre kért EIC kromatogramok eltérő lefutása alapján egyértelművé vált, hogy a 2. komponens egy további formája a korábban a kontroll mintában talált egyik komponensnek (lásd: **11. táblázat**), amely feltételezhetően fenhexamid melléktermék. Az említett EIC-k és azok összehasonlítása látható a **15. ábrán**.



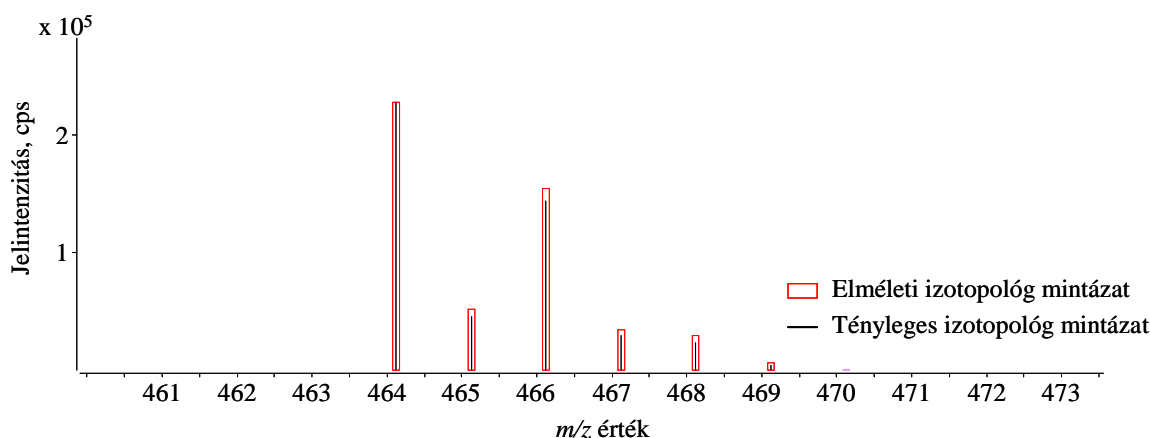
15. ábra: A 2. komponens korábban (SPE nélküli mintában) megtalált m/z 471,1056 és a differenciálónak vélt m/z 879,2802-es érték EIC kromatogramjainak azonos időbeli lefutása.



16. ábra: Az 5. komponens MS^1 tömegspektruma, illetve az m/z 302,0727-es és m/z 464,1252-es értékek EIC kromatogramjai.

A komponensek közül az 5. komponens (m/z 464,1252) bizonyult a legintenzívebbnek, magas jel/zaj aránya és mass defect értéke is megfelelt. A 26,8 perces retenciós időnél rögzített tömegspektrumban is megtalálható a fenhexamidra utaló 302,0727-es m/z érték, ez a komponens azonban nem lehet a fenhexamid, mert az 30,0 perces retenciós időnél jelentkezik (**14. ábra**). A két említett csúcs időbeli lefutása teljesen megegyezik, ahogy az az EIC-k alapján is egyértelmű. Ez a tény arra utal, hogy a fenhexamid az ionforrásban hasad ki a molekulából, úgynevezett „in-source” fragmensként jelentkezik (**16. ábra**). Ez azt jelzi, hogy fenhexamid származékról van szó.

A molekulaion és a fragmensként detektált fenhexamid közötti 162,0525 Da-os tömegkülönbség egy kiasadt glükóz egységre utal, mely megfigyelés rendkívül fontos információként szolgált a komponens szerkezetének kiderítésében. Az izotopológ eloszlás, pontos tömeg és az in-source fragmensként detektált fenhexamid ($C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$) alapján a $C_{20}H_{27}Cl_2NO_7$ összegképlet bizonyult a legvalószínűbbnek (**17. ábra**), ami pontosan a glükóz egység $C_6H_{10}O_5$ összegképletében különbözik a fenhexamidtól. Érdeemes megemlíteni, hogy a készülék tömegpontossága az alapján is igazolható, hogy az elméleti és a tapasztalt pontos tömeg közötti eltérés (elméleti m/z 464,1238, $\Delta=3,32$ ppm) a számított tömegpontosság tartományba esik.



17. ábra: Az 5. komponens tényleges és a $C_{20}H_{27}Cl_2NO_7$ összegképlet elméleti izotopológ eloszlásának összehasonlítása.

Ráadásul, a fenhexamid glükóz származéka, a fenhexamid-*O*-glükozid egyike az eddig azonosított növényi detoxikációs termékeknek (EFSA, 2013; European Parliament, E. C., Regulation (EC) No. 396/2005, 2005; Polgár és mtsai., 2012). Annak ellenére, hogy a glikozilálás a baktériumok esetén a komponensek oldhatóságának, illetve stabilizálásának egy ismert módja (Hyung Ko és mtsai., 2006; Kim és mtsai., 2012), a fenhexamid-*O*-glükozidot és ismereteink szerint egyetlen más peszticid-glikozidot sem azonosítottak még korábban baktériumokban.

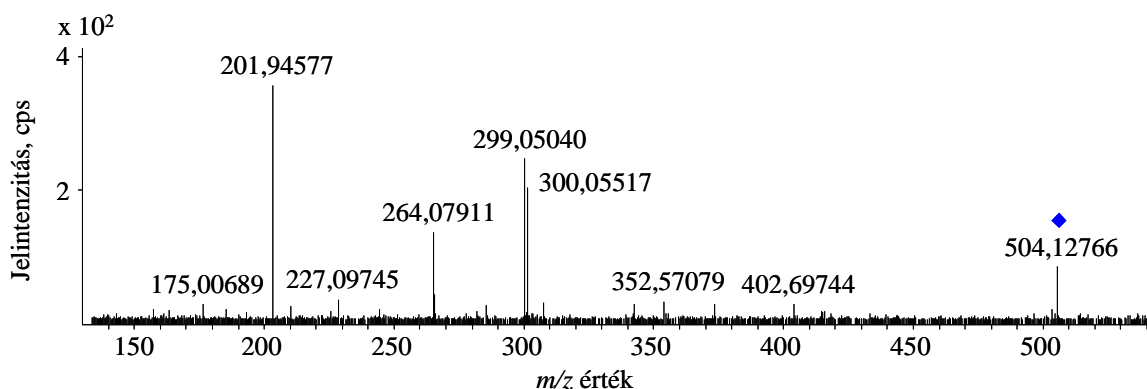
14. táblázat: Az SPE dúsítás utáni felülúszókban negatív ion módban, a szoftver által differenciálónak vélt komponensek felülvizsgált jellemzői. A komponensek az összegképlet generálásra kapott score értékek alapján vannak rendezve.

Komponens száma	MFG score	Semleges tömeg, Da	t_R , perc	Jelintenzitás, cps	Jel/zaj arány	Tömegdefektus (A+2), mDa
6. komponens	92,7	390,1622	34,2	$3,9 \times 10^3$	27,5	-12,6
7. komponens	94,5	229,0502	31,6	$2,7 \times 10^3$	6,1	1,6
8. komponens	94,6	417,0818	38,3	$2,3 \times 10^3$	27,0	1,1
9. komponens	97,4	317,0587	29,3	$9,2 \times 10^3$	72,0	2,2
10. komponens	97,8	505,1279	28,4	$1,7 \times 10^4$	600,7	2,3
11. komponens	98,2	463,1164	26,8	$1,5 \times 10^6$	>10000	2,5

Negatív ion módban ugyanolyan módon folyt a klór-tartalmú metabolitok keresése, mint pozitív mód esetén. A szoftveres keresés és adatfeldolgozás után hat komponenst ellenőriztem manuálisan. E komponensek tömegspektrumai a mellékletben (M2. ábra) láthatók. Ahogy a **14. táblázatban** látszik, a komponensek túlnyomó része kis intenzitású. Abból kiindulva, hogy dúsítva lettek a minták, ráadásul ez a QTOF készülék negatív módban kb. 40-szer érzékenyebb, mint pozitívban, a kis intenzitású komponenseket nem próbáltam meg azonosítani. Az azonosításhoz elfogadható intenzitású komponens a 10. és 11. komponens volt. Az utóbbi azonban nem más, mint a pozitív módban talált 5. komponens negatív módban ionizálódó megfelelője. A feltételezett fenhexamid-*O*-glükozid esetében inkább pozitív módú ionizáció

várható a bázikus nitrogén atom jelenléte miatt, de a komponens negatív ion módban is jól ionizálódott (lásd: melléklet M3. ábra). A negatív módú ionizáció egy nagy előnye mutatkozik meg abban, hogy szinte ugyanakkora jelintenzitás mellett jelentősen megnő a jel/zaj arány. Ennek magyarázata, hogy a komponensek nagyobb hányada sokkal inkább hajlamos a pozitív, mint a negatív módú ionizációra, következésképpen a célkomponens mellett kevésbé ionizálódó háttérkomponensekből kevesebb zaj keletkezik.

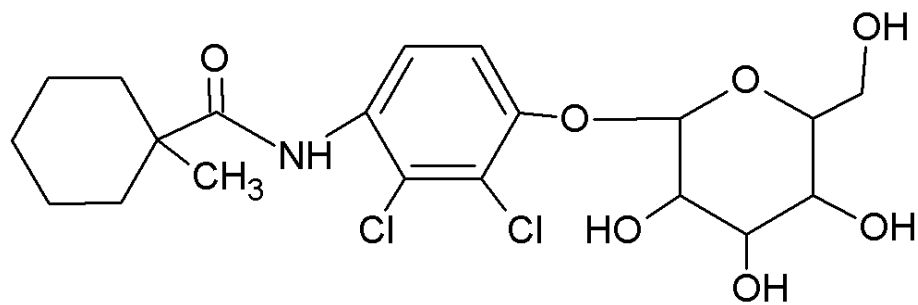
A 10. komponens (m/z 504,1211) jel/zaj aránya elégnek bizonyult az MS^2 fragmentációk elvégzéséhez. Ahogy a 18. ábrán is látható, a fenhexamid ugyancsak megjelenik a 10. komponens MS^2 tömegspektrumában (csakúgy, mint a fenhexamid-*O*-glükózid esetében), ami azt támasztja alá, hogy ez a komponens is fenhexamid eredetű. Ha az előzőekben tapasztalt analógiát vezetjük tovább, valószínű, hogy a fenhexamid egy másik konjugátuma a kérdéses komponens, pl. malonil- vagy glükoronidsav-konjugátum. Mivel azonban sajnos az MS^2 fragmensek intenzitása és a tapasztalt tömegpontosság nem bizonyult elegendőnek az egyértelmű azonosításhoz, és nincs korábban azonosított, a 10. komponens tömegének megfelelő fenhexamid származék, ez a komponens nem volt egyértelműen azonosítható jelen körülmények között. A komponens intenzitására lehetőséget adott volna a gradiens további módosítása a 10. komponens intenzívebb ionizációjának elősegítése miatt, standard vegyület híján azonban így sem kerültem volna közelebb az egyértelmű azonosításhoz.



18. ábra: A 10. komponens MS^2 spektruma, ahol a 300,05517 m/z érték a fenhexamid deprotonált formája, jelezve, hogy a komponens egy fenhexamid eredetű anyagcseretermék. A kék rombusz jelzi a prekursor iont.

5.1.6 Komponensazonosítás

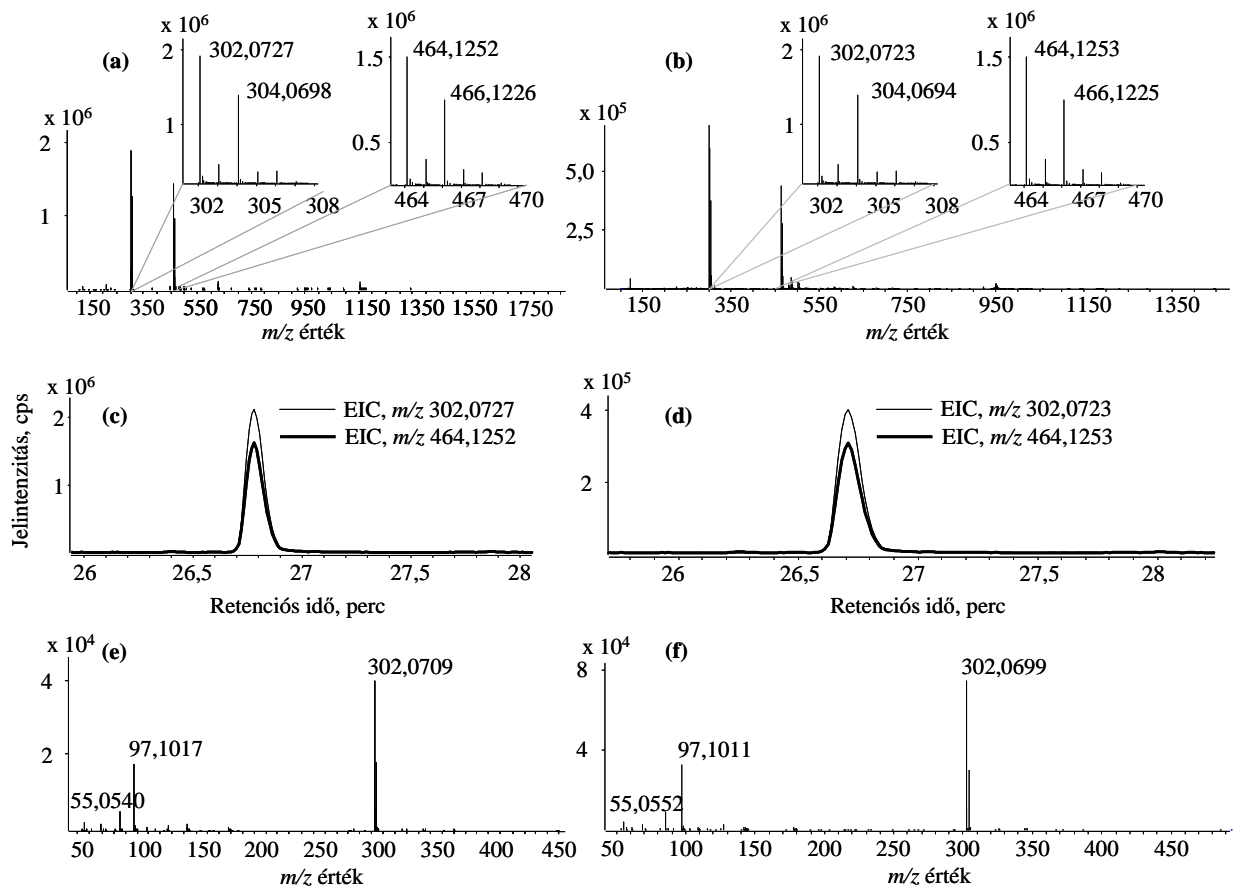
A korábban részletezett tapasztalatok alapján racionális magyarázatnak bizonyult a fenhexamid-*O*-glükózid megjelenése, azonban hogy egyértelműen alátámasszam ezt a feltételezést, standard oldattal végzett MS^2 kísérletekre volt szükség. Az Alkalmazott Kémia Tanszéken rendelkezésre állt az egyedi szintézis során nyert fenhexamid-*O*-glükózid standard, amely egyébként kereskedelmi forgalomban nem kapható (19. ábra).



19. ábra: Fenhexamid-*O*-glükózid szerkezeti képlete.

A standardból 4 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú oldatot készítettem, majd addicionáltam vele a mintát 1 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban. A kísérlet eredményeképpen a mintában lévő 5. komponens és a standard oldatban található fenhexamid-*O*-glükózid retenciós ideje és fragmentációja teljes egyezést mutatott, ennek értelmében sikeres volt az azonosítás (**20. ábra**).

Az addicionálási kísérletet az *O*-glikozilált termék mennyiségének meghatározásához is felhasználtam. A dúsítási kísérlet veszteségeivel, illetve intracelluláris maradékkal nem számolva a fenhexamid kb. 0,1%-a alakult át fenhexamid-*O*-glükoziddá. Az biotranszformáció jelentősen alacsonyabb, mint a növényeknél megfigyelt 24%-ot is meghaladó arány (Anderson és mtsai., 1999). A megfigyelés alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a baktériumok általi glikozilálás nem tartozik a tipikus bakteriális detoxikációs útvonalak közé, úgymint a specifikus és nem specifikus hidroláz, mono- és dioxigenáz enzimek aktivitása során megvalósuló detoxikáció.



20. ábra: Az 5. komponens és a fenhexamid-*O*-glükózid standard oldatának vizsgálatára kapott MS¹ és MS² tömegspektrumok, illetve kromatogramok egyezése alapján sikerült bebizonyítani az 5. komponens azonosságát: *L. casei* mintában (a) és 5 µg/ml-es fenhexamid-*O*-glükózid standard oldatban (b) 26,8 percnél kapott MS spektrum, *m/z* 464,1252 EIC kromatogramja a mintában (c) és a standard oldatban (d). Fenhexamid-*O*-glükózid MS² spektruma mintában (e) és standard oldatban (f).

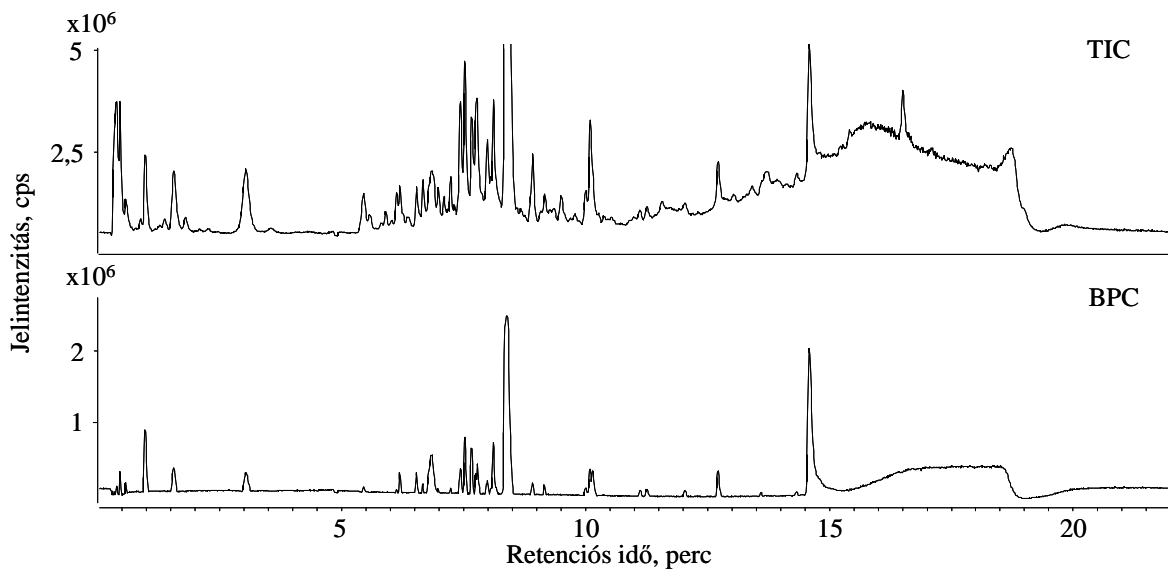
Publikálási tevékenység:

Lénárt, J.; Bujna, E.; Kovács, B.; Békefi, E.; Száraz L.; Dernovics, M. (2013) Metabolomic approach assisted high resolution LC-ESI-MS based identification of a xenobiotic derivative of fenhexamid produced by *Lactobacillus casei*. *J. Agric. Food Chem*, 61 (37), pp. 8969-8975

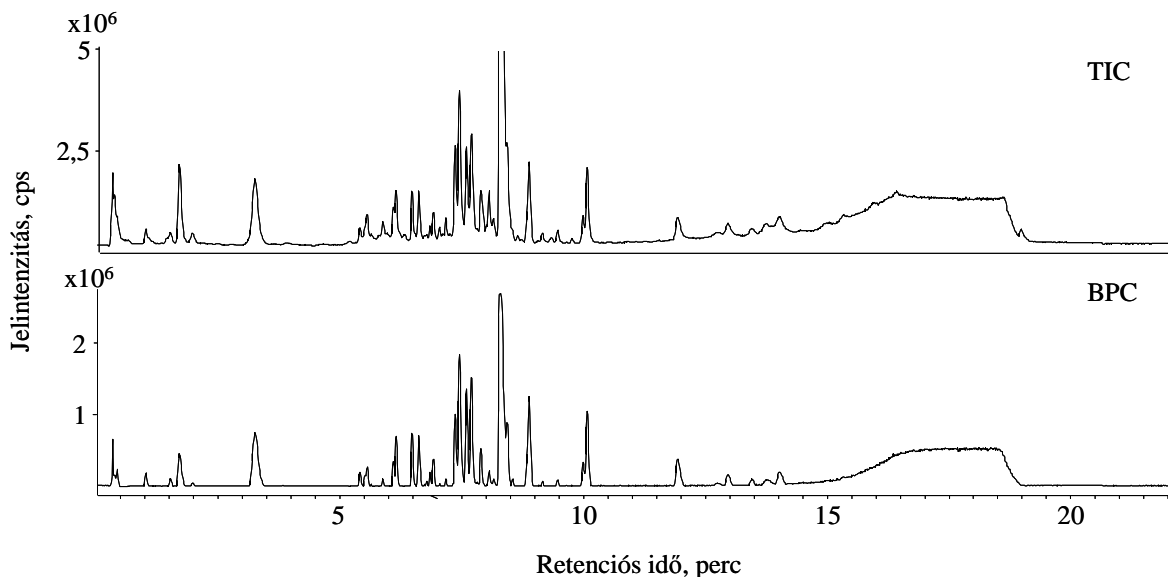
5.2 A kajszi önmeddőségi reakcióinak vizsgálata metabolomikai ujjlenyomat készítéssel

5.2.1 Metabolomikai ujjlenyomat készítés, növényi metabolitok keresése

Az előkészített mintákban a műszeres meghatározást követően MFE algoritmussal végeztem a metabolitok keresését. A keresés ugyancsak nem célzott módon történt, azonban egyáltalán nem jelölhettünk ki célkomponenseket, így nem volt olyan közös tulajdonság, amely alapján leszűkült volna az azonosítandó molekulák köre. Az alkalmazott metanolos extrakciónak köszönhetően nagyszámú komponens jelenlétét figyelhetjük meg a kapott TIC és BPC kromatogramokon (**21.** és **22. ábra**).



21. ábra: CO 96h minta (lásd: **6. táblázat**) pozitív módban kapott TIC és BPC kromatogramjai.



22. ábra: CO 96h minta negatív módban kapott TIC és BPC kromatogramjai.

A komponensek rendezése után összesen 4755 komponenst talált a szoftver pozitív módban és 1845-öt negatív ion módban. Ezek száma nem adható össze, hiszen a két csoport között lehetnek, illetve vannak is átfedések. A szoftveres keresés teljesítménye szempontjából azonban ez véleményem szerint nem jelent súlyos hibát, hiszen célom nem a helyes, minden hibától mentes komponensazonosítás és spektrumértékelés volt, hanem az intenzitás értékek alapján való különbségfelismerés. A szoftver hibamentes működése biológiai mátrixban, nagy komponensszámok esetén nem reális elvárás, viszont mindenképpen hasznos, illetve szükséges a különbségtételhez, hiszen a kromatogramokban megjelenő összes tömegspektrum átvizsgálása nem emberi léptékű feladat, ahol pedig statisztikailag szignifikáns különbséget érzékel a szoftver, már manuálisan is ellenőrizhető és az esetleges tévedések manuálisan felülbírálnak.

Az algoritmus lefuttatása során azonban törekedtem a minél hatékonyabb működésre, ezért a korábban bemutatott peszticid standard oldattal való optimálás paramétereit jelen esetben is alkalmaztam. Bár kajsizibékben nem vártam klór-tartalmú komponenseket, a beállítások változtatását semmi nem idokolta, hiszen nem klór-specifikusak a beállított paraméterek, céljuk a helyes izotopológ mintázat felismerése volt, az eredmények alapján pedig megfelelőnek bizonyultak az MFE beállításai.

A párhuzamos minták közötti azonosságot PCA-val ellenőriztem, mely ábrázolásmód megfelelő eszköz arra, hogy a kiugró mintákat észre lehessen venni. A kajsziminták esetén nem volt kiugró minta, a három párhuzamosból álló csoportokon belüli minták egymással jó egyezést mutattak. Ez a megfigyelés jó visszajelzés arra, hogy a szoftver viszonylag reprodukálhatóan jelöli ki a komponenseket.

5.2.2 Differenciáló komponensek meghatározása

A kiértékelés során alkalmazott mindkét szoftver esetében ugyanazokat a statisztikai módszereket, azaz csoporton belüli gyakoriságvizsgálatot, monotonitásvizsgálatot, t-próbát és PCA-t alkalmaztam.

Egy csoportnak tekintetem az azonos genotípusból származó, azonos megporzási idő után gyűjtött három-három párhuzamos mintát (biológiai párhuzamosok: három különböző bemérés és extrakció), ezáltal összesen nyolc csoport jött létre.

A csoportokon belüli gyakoriságvizsgálat során szabott kritérium szerint csak azok a komponensek maradtak bent a komponenslistában, melyek a minták 100%-ában (háromból három párhuzamos mintában) megtalálhatók voltak, ezzel a biológiai variabilitásból származó divergencia csökkentésére törekedtem. A csoporton belüli komponensek intenzitásértékeit ezután átlagoltam.

A korábban ismertetett statisztikai módszereken felül ez esetben az idő függvényében is végig követtem a metabolitok intenzitásának változását, így egy további tényező állt

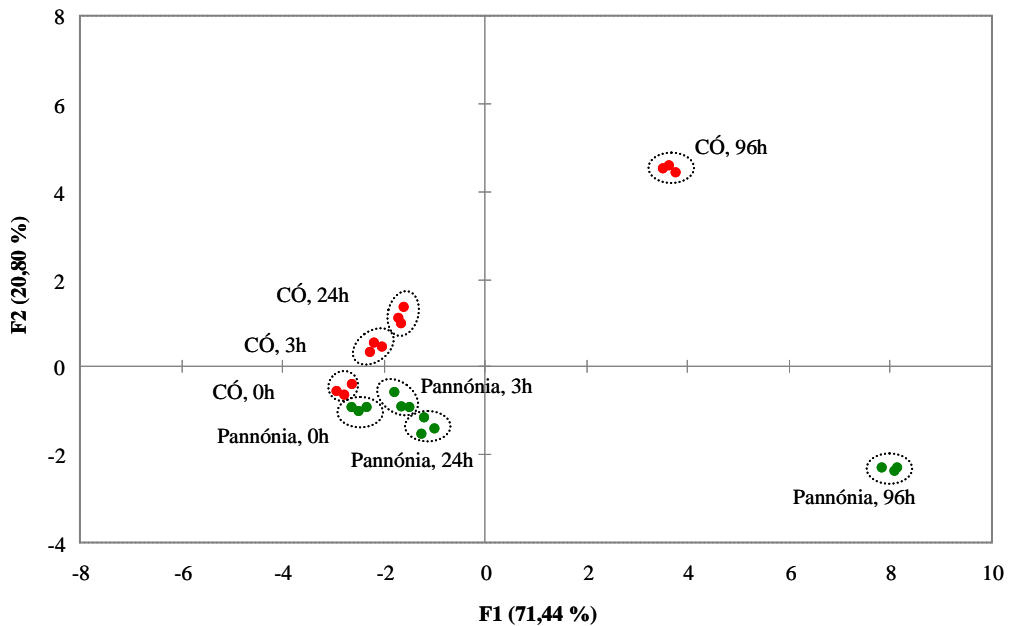
rendelkezésekre, mintha csupán a két csoportot hasonlítottam volna össze. A monotonitásvizsgálat segítségével meghatároztam, melyek azok a komponensek, amelyek időben monoton növekedést, illetve csökkenést mutatnak. Mivel irodalmi adatokból tudjuk, hogy a pollentömlő növekedésének előrehaladása a megporzás után eltelt idő függvénye, ezért a belőle származó információ mindenképp releváns, érdemben segít a megkülönböztető komponensek kiszűrésében.

Ezt követően t-próbával 99,9%-os szignifikancia szint mellett megnéztem, hogy a komponensek intenzitásértékeinek időben történő növekedése, illetve csökkenése szignifikáns-e. Biológiai mintáknál nem szokványos az ilyen szigorú szignifikancia szint alkalmazása, hiszen nagy a biológiai variabilitásból eredő szórás, azonban esetemben mindkét ionizációs módban nagyszámú (4006 és 1005) komponenszt detektált a szoftver, amely hatalmas adathalmaz, különösen jelen esetben, ahol ennek manuális átvizsgálása is indokolt. 99,9%-os szignifikancia szint mellett 72, 99%-os mellett 280 komponens, 95%-os mellett pedig 386 szignifikáns mértékben megkülönböztető komponens adódott.

Az alacsonyabb szignifikancia szinteken végrehajtott t-próba túl „engedékenynek” bizonyult, ami azt eredményezte, hogy a megkülönböztető komponensek listája túlságosan hosszú volt. Ezen felül a nagy mátrixhatásnak köszönhetően nagyszámú hibás találatra számítottam, ami - ahogy azt a későbbiekben is részletezem - beigazolódott. A biomarkerek keresése céljának a szigorú szűrés eredményeként kapott komponenslista megfelelőnek bizonyult. A végső komponenslistát manuálisan ellenőriztem, hogy a redundáns eredményeket eltávolítsam és kijavítsam az esetleges integrálási hibákat, így végül korrigált listát hoztam létre.

Utolsó lépésben végül PCA segítségével ábrázoltam, mennyire különülnek el egymástól a csoportok, illetve meghatároztam melyek azok a komponensek, amelyek az eddig kiszűrték közül a legszignifikánsabbak a megkülönböztetésben.

A statisztikai kiértékelés megbízhatóságát és reprodukálhatóságát jól mutatja, hogy a két lista ugyanazokat a komponenseket tartalmazta. Pozitív módban 72, míg negatív ion módban 61 megkülönböztető komponenszt talált a szoftver, mely két komponenslistát egyesítettem, majd manuálisan ellenőriztem a listát és a mindkét módban megjelenő komponensekből adódó redundanciát, illetve az egy komponenshez tartozó téves „feature”-ket eltávolítottam. Az eddigiék után kapott 103 komponens figyelembevételével készült PCA nagyon jó megkülönböztetési képességről árulkodik (**23. ábra**).



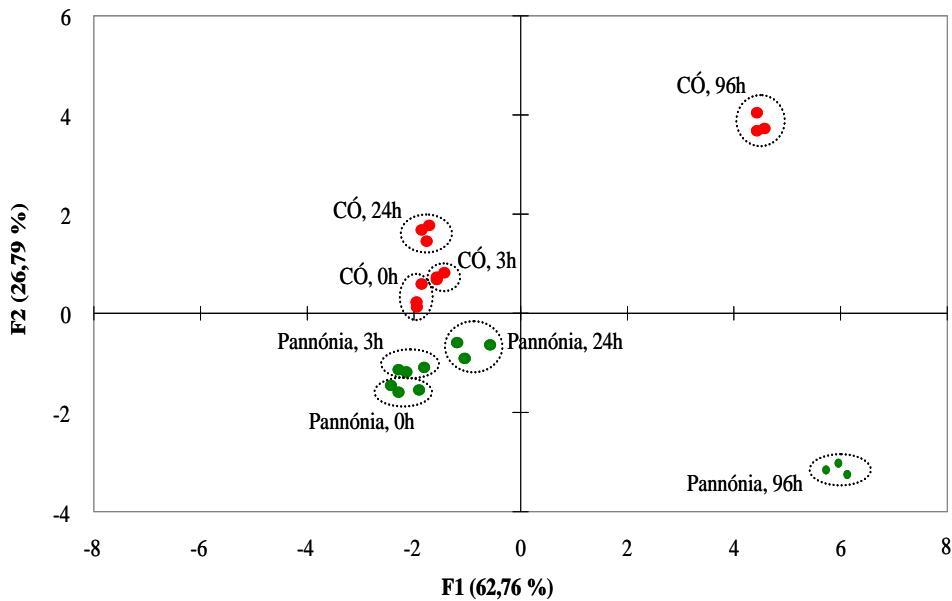
23. ábra: A két eltérő kajszi genotípusból származó minták megkülönböztetése PCA-val.

A komponensek azonosságát úgy ellenőriztem, hogy megkerestem az eltérő polaritású, de azonos retenciós időnél jelentkező komponenseket és a tömegspektrumuk alapján eldöntöttem, ugyanarról a komponensről van-e szó. Ahol szükséges volt, a csúcsterületek integrálásának hibáit is kijavítottam, az így kapott intenzitásértékeket pedig a belső standard területével korrigáltam. A komponenseket, melyek mindkét csoport mintáiban nagyon kis intenzitásúak és rossz jel/zaj arányúak voltak, hiába voltak eltérő intenzitásúak (jelintenzitás $<10^4$ cps), kiszűrtem és figyelmen kívül hagytam, hiszen tömegbeli és az izotopológok eloszlásának pontatlansága miatt azonosításuk nem volt kivitelezhető. Értelmszerűen, az időben növekvő komponenseket a 96 órás mintákban, míg a csökkenőket a 0 órás mintákban értékeltem, illetve az ottani intenzitásértékeik alapján szűrtem.

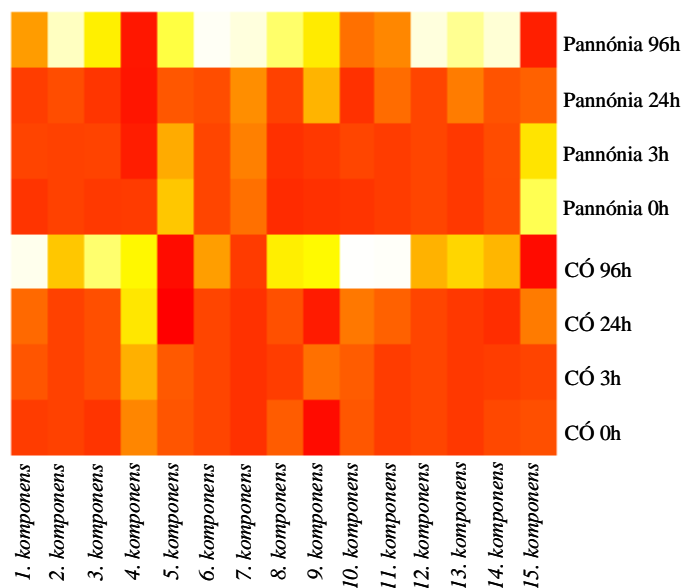
A jelenlegi minták esetében azt gondoltam, hogy az SPE-vel történő dúsítás sem segíthet, hiszen a kromatogram zsúfoltsága miatt előforduló sok koelúció miatt a kisebb komponensek nem tudtak volna ionizálódni a koelválódó intenzívebb komponensek mellett. Több ezer komponens kromatográfiás elválasztásának kifejlesztése pedig túl nagy feladat lett volna, ezért azt a kompromisszumos megoldást választottam, hogy nem dúsítom, illetve hígítom tovább a mintákat.

Végül 15, szignifikáns megkülönböztető komponenst találtam. A végső lista alapján végzett PCA és Heatmap ábrázolás alapján a minták mind megporzási idő, mind kompatibilitás szerint egyértelműen megkülönböztethetők egymástól, ami a **24.** és **25. ábrán** látható. A Heatmap ábrázolás lényege, hogy az egyes komponensek különböző mintákban található intenzitásuk szerint különböző színekkel jelennek meg. Minél mélyebb a szín, annál nagyobb a kérdéses komponens intenzitása az adott mintában. A Heatmap megjelenítés nem szolgál többlet

információval a PCA-hoz vagy táblázatos megjelenítéshez képest, egyszerűen a szemléletesség célját szolgálja.



24. ábra: A két eltérő kajszi genotípus megkülönböztetése a korrekció után végzett PCA-val.



25. ábra: A két eltérő kajszi genotípusban megtalálható differenciáló komponensek Heatmap ábrázolásmódban.

A PCA futtatása során nem alkalmaztam számított változókat, minden változó azonos információt mér, megfelelő a korreláció a változók között és a Kaiser-Meyer-Olkin mutatószám 0,738-as értéket adott, vagyis a PCA megfelelőnek mondható. Az első két főkomponens a teljes variancia 89,55 %-át magyarázza (F1:62,76%, F2:26,79%). Az F1 és F2 főkomponensekhez legnagyobb mértékben hozzájáruló metabolitok a **15. táblázatban** találhatóak. A fajták és velük együtt az önmeddő/öntermékenyülő reakciók az F2 szerint különülnek el, míg az F1 a megporzási idő szerinti megkülönböztetésért felelős.

Mindezen megfigyelések alapján arra a megállapításra jutottam, hogy ebben a rendszerben, adott detektálási körülmények között az F2 főkomponenshez legnagyobb mértékben hozzájáruló metabolitoknak lehet szerepe az önmeddőségi reakció kialakulásában. E metabolitok a 4., 5., 7. és 10. komponens.

15. táblázat: Az egyes metabolitok hozzájárulása a PCA két főkomponenséhez

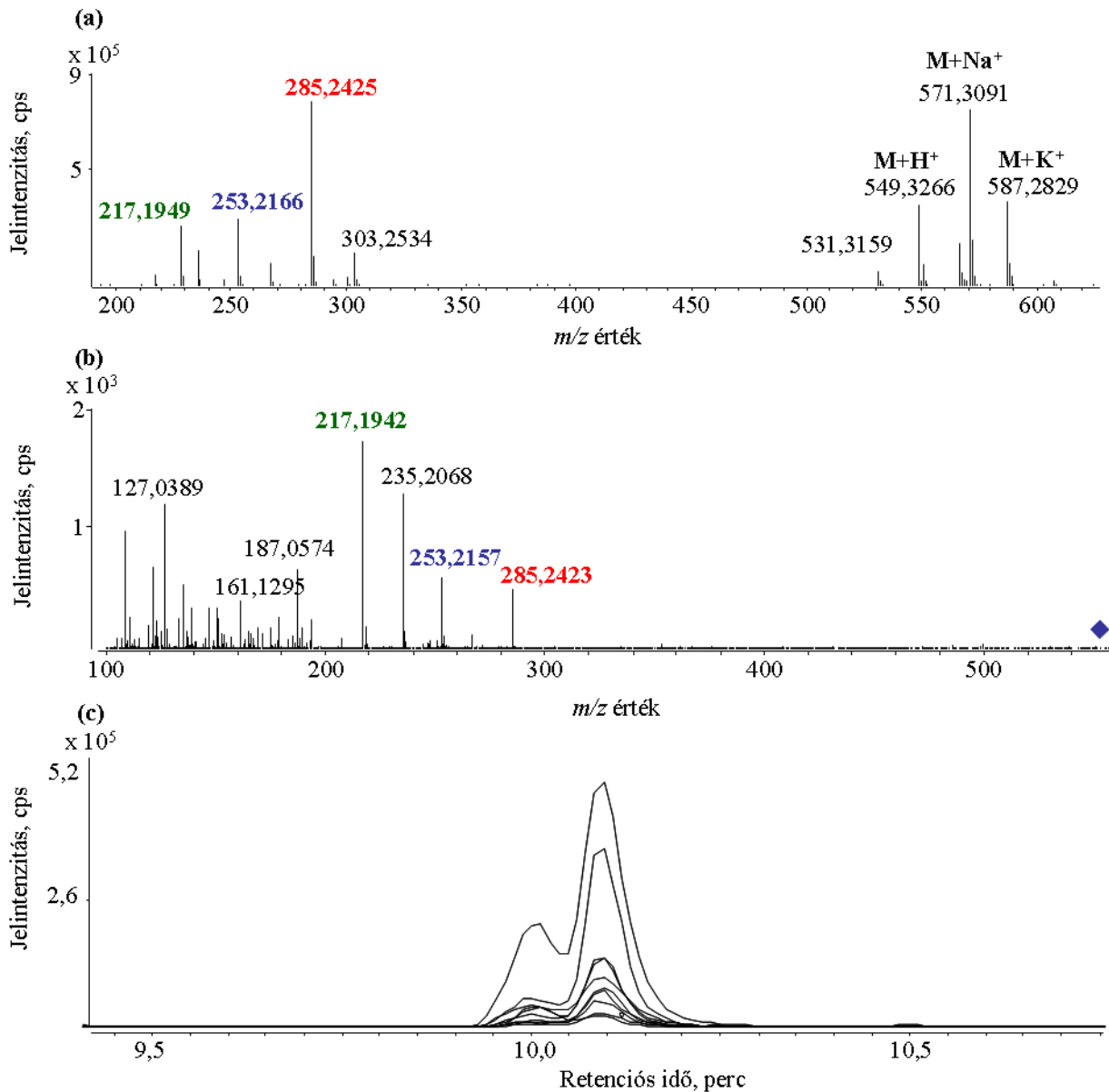
Komponens azonosító száma	t_R , perc	m/z érték*	semleges tömeg, Da	F1 négyzetes koszinusz értékei	F2 négyzetes koszinusz értékei	polaritás
1. komponens	8,9	535,3099	534,3021	0,595	0,346	pozitív
2. komponens	0,5	423,1261	422,1183	0,935	0,045	pozitív
3. komponens	8,2	493,3055	492,2977	0,876	0,063	pozitív
4. komponens	10,1	549,3266	548,3184	0,002	0,803	pozitív
5. komponens	0,4	204,0871	203,0793	0,061	0,785	pozitív
6. komponens	6,0	291,0980	290,0902	0,833	0,131	pozitív
7. komponens	9,5	316,2846	315,2772	0,373	0,594	pozitív
8. komponens	6,1	331,1533	330,1455	0,957	0,001	pozitív
9. komponens	5,4	393,1767	348,1776	0,734	0,003	negatív
10. komponens	8,7	577,3230	578,3302	0,400	0,542	negatív
11. komponens	0,4	209,0301	210,0362	0,518	0,363	negatív
12. komponens	7,8	785,3622	786,3700	0,886	0,081	negatív
13. komponens	7,2	611,3280	612,3358	0,947	0,025	negatív
14. komponens	0,7	218,1026	219,1111	0,881	0,099	negatív
15. komponens	9,7	1083,6270	1084,6355	0,417	0,138	negatív

- a feltüntetett értékek a komponensek átlag m/z értékeit jelentik, amelyek a komponensek átlag tömegspektrumaiból származnak
- a vastagon szedett értékek a metabolithoz tartozó legnagyobb négyzetes koszinusz értékét jelölik

5.2.3 Differenciáló komponensek azonosítása

A legnagyobb intenzitású és legnagyobb mértékben megkülönböztető metabolitnak a 4. komponens bizonyult, amely monoton intenzitásnövekedést mutatott az idő függvényében az önmeddő 'Ceglédi óriás' fajtában, pozitív ionmódban (negatív módban is megkülönböztető). A komponens retenciós idejénél, 10,1 percnél rögzített tömegspektrumban számos in-source fragmens és addukt volt megfigyelhető. Ezek közös származását EIC kromatogramjaik időbeli lefutásának hasonlósága alapján ellenőriztem, melyek jó egyezést mutattak. A monoizotópos tömeg protonált formáját úgy határoztam meg, hogy CID fragmentálásra jelöltem ki az MS¹ spektrumban jelen lévő molekulaionokat, és amelyek MS² spektrumában megtalálhatók voltak az

in-source fragmensek, azt tekintetem protonált formának, jelen esetben ez az m/z 549,3266 ion volt (26. ábra). Az in-source fragmensek jelenléte azért is bizonyult nagyon hasznosnak, mert így a teljes izotopológ mintázatuk megjelent, ami alapján pontosabban meg tudtam határozni összegképletüket (MS² spektrumban az izotopológ eloszlás nem pontos).



26. ábra: A 10,1 perc retenciós idejű m/z 549,3266-es értékű molekulaion MS¹ (a) és MS² (b) tömegspektrumában jelenlévő közös ionok bizonyítják, hogy a nevezett tömegszámú ion a molekula protonált formája, a kisebb ionok pedig a fragmensei. Az ábrán látható számos fragmens EIC-inek időbeli lefutásának azonossága is ezt bizonyítja (c). A kék rombusz jelzi a prekursor iont.

Az összegképlet generálást az Agilent MassHunter Qualitative Analysis szoftverrel végeztem, az 5.1.3.3 fejezetben ismertetett beállítások szerint, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a felhasználható elemek között nem szerepelt klór. Az összegképlet generálást az m/z 285,2425 értékű, legintenzívebb in-source fragmensessel kezdtem. Tapasztalataim alapján a 90-es

MFG score érték fölöttiek a reálisak, 90-es érték alatt nem tekintetem relevánsnak a találatokat. A fenti beállítások mellett az egyetlen reális összegképlet a $C_{17}H_{32}O_3$ volt ($(M+H)^+$ $C_{17}H_{33}O_3$, elméleti m/z érték: 285,2424, $\Delta=0,2$ ppm, MFG score=99,45), a többi találat MFG score értéke mind jelentősen 90 alatt volt.

A következő lépésben a protonált molekulaion tömegére generáltam összegképleteket, a fent részletezett beállításoktól csak a megengedett szénatomszám tekintetében tértem el. Mivel biztos voltam benne, hogy az m/z 285,2425 értékű ion a molekula fragmense, ezért az összegképletében minimum 17 szénatomnak kell jelenlennie, tehát a szoftvernek 17 és 60 közötti szénatomszámmal kellett kalkulálnia.

A generált összegképleteket a **16. táblázatban** adom meg, amelyeket MFG score értékük szerint rendeztem. A kritériumok alapján 18 ilyen találat volt, amelyek közül manuális vizsgálat során szűrtem ki a nem lehetséges összegképleteket.

Első körben meghatároztam az A+1-es izotopológ relatív intenzitását az A izotopológhoz képest, mely értéke 28,6% volt. Ebből az értékből kiszámítottam a körülbelüli szénatomszámot, mivel az A+1-es izotopológ relatív gyakoriságához túlnyomórészt a ^{13}C izotóp járul hozzá (1,08% relatív gyakoriság). A kapott érték $(28,6/1,08)$ 26,48 lett, amely szerint 26 vagy 27 a reális szénatomszám, kis ráhagyással számolva ezért én a 25 és 28 szénatomszámú összegképleteket vettem figyelembe a továbbiakban, ezáltal a lehetséges találatok száma drasztikusan lecsökkent.

16. táblázat: A 4. komponens lehetséges összegképletei.

Összegképlet (M+H) ⁺	Elméleti <i>m/z</i> érték	Δ ppm	MFG score	RDBE érték*
C₂₇H₄₉O₁₁	549,3269	0,7	99,14	4
C ₂₂ H ₄₆ N ₈ O ₆ P ^{**}	549,3272	0,9	98,22	5
C ₂₁ H ₅₀ N ₄ O ₁₀ P ^{**}	549,3259	1,3	96,81	0
C ₂₄ H ₄₁ N ₁₀ O ₅ ^{**}	549,3256	2,1	95,88	10
C ₂₄ H ₅₃ N ₆ P ₄ ^{**}	549,3277	1,9	95,54	4
C₂₅H₃₇N₁₄O	549,3269	0,2	95,35	15
C ₂₄ H ₅₁ N ₆ O ₂ P ₂ S ^{**}	549,3264	1,1	94,99	4
C ₃₁ H ₅₁ O ₄ P ₂ ^{**}	549,3257	1,4	93,66	8
C ₁₉ H ₃₈ N ₁₈ P ^{**}	549,3259	2,0	93,36	11
C ₁₇ H ₄₃ N ₁₆ OP ₂ ^{**}	549,3275	1,0	93,20	6
C₂₈H₄₅N₄O₇	549,3283	3,1	92,43	9
C₂₅H₅₂N₄O₃P₃	549,3247	3,5	92,05	4
C ₂₃ H ₄₂ N ₁₂ O ₂ P ^{**}	549,3286	3,3	91,97	10
C ₃₀ H ₅₀ N ₂ O ₃ PS ^{**}	549,3274	1,1	91,89	8
C ₂₀ H ₄₉ N ₆ O ₉ S ^{**}	549,3276	1,2	91,68	0
C ₃₂ H ₄₆ N ₄ P ₂ ^{**}	549,3271	0,9	90,60	13
C ₁₇ H ₄₁ N ₁₆ O ₃ S ^{**}	549,3263	1,8	89,80	6
C ₂₃ H ₄₅ NO ₉ ^{**}	549,3243	4,4	89,79	5

* az RDBE értéket a molekulaionon töltést biztosító proton szerint korrigáltam

** nem megfelelő szén atomszám miatt kieső találatok

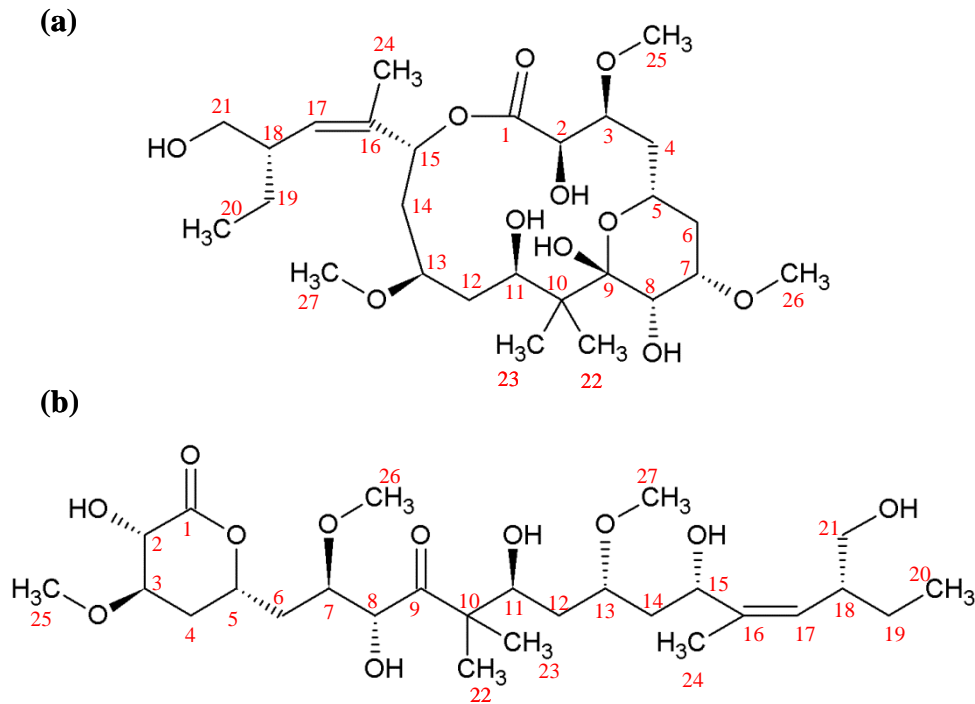
A megmaradt összegképletek közül a C₂₅H₃₇N₁₄O összegképletet ezek után azért zárhattam ki, mert a fragmens összegképlete szerint legalább 3 oxigénnek kell jelenlennie a prekursor ionban. További megfigyelésem, hogy az *m/z* 531,3159 in-source fragmens egy vízvesztés eredménye (ezt az MFG score is alátámasztja), mely további egy oxigén jelenlétét predesztinálja, így a prekursor molekulaion legalább 4 oxigént tartalmaz, ami alapján a C₂₅H₅₂N₄O₃P₃ összegképletet is kizártam. A maradék két találat közül mind az MFG score, mind pedig a tömegpontosság a C₂₈H₄₅N₄O₇ összegképlet ellen szólt, amit az is egyértelműsít, hogy az *m/z* 531,3159 in-source fragmensre generált összegképletek közül a C₂₇H₄₇O₁₀ bizonyult messzemenően a leginkább reálisnak (C és O atomszámot is figyelembe véve, elméleti *m/z* érték: 531,3163, Δ =1,1 ppm, MFG score=98,23), míg a C₂₈H₄₅N₄O₇ összegképletből vízvesztéssel kapott C₂₇H₄₃N₄O₆ mutatói jelentősen kedvezőtlenebbek voltak (elméleti *m/z* érték: 531,3177, Δ =3,5 ppm, MFG score=91,76).

Ezek után az összegképlet alapján adatbázisos keresést folytattam, amely adatbázisok közül a legtöbb információval a DNP és a Scifinder szolgált. A DNP adatbázisban két, míg a Scifinderben 27 találat felelt meg ennek az összegképletnek. MS² spektrumok nem voltak elérhetők egyik találat esetén sem, azonban az általam rögzített MS² spektrum információdúsnak bizonyult, így az alapján ki tudtam szűrni a biztosan nem megfelelő találatokat. A legintenzívebb *m/z* 285,2423 értékű in-source fragmens alapján egy egybefüggő, legalább C₁₇ hosszú láncot kerestem, valamint a további víz és metil csoportok vesztéséből keletkező fragmensek alapján olyan szerkezeteket, amelyekben hidroxil és metil, vagy -*O*-metil csoportok vannak jelen (**17. táblázat**).

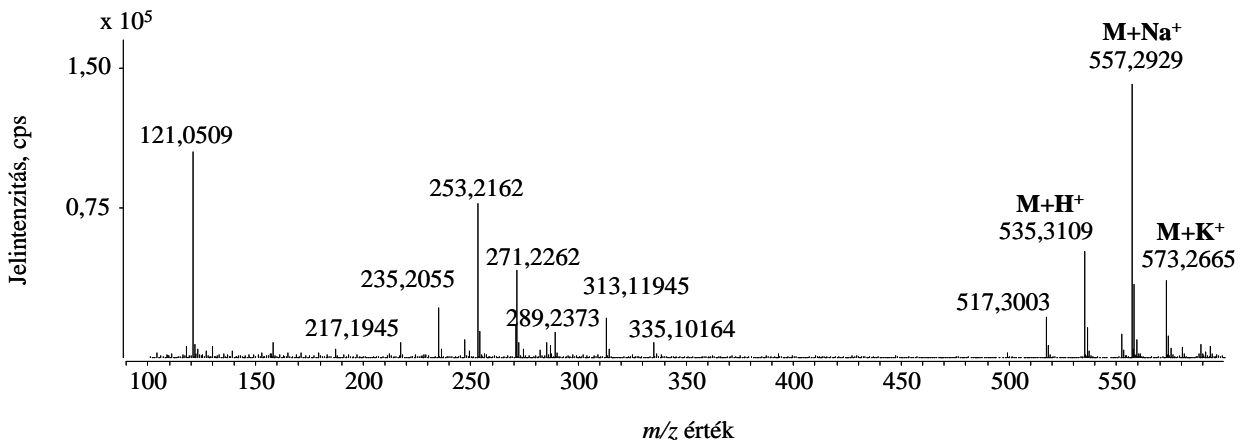
17. táblázat: A 4. komponens in-source fragmenseinek tulajdonságai.

Sorszám	<i>m/z</i> érték	Összegképlet, (M+H) ⁺	Keletkezés
1.	531,3159	C ₂₇ H ₄₇ O ₁₀	(M+H) ⁺ -H ₂ O
2.	285,2429	C ₁₇ H ₃₃ O ₃	?
3.	267,2320	C ₁₇ H ₃₁ O ₂	2. -H ₂ O
4.	253,2166	C ₁₆ H ₂₉ O ₂	3. -CH ₂
5.	235,2075	C ₁₆ H ₂₇ O	4. -H ₂ O
6.	217,1949	C ₁₆ H ₂₅	5. -H ₂ O

Mindezen megfigyelésekre alapozva a Peloruside A tünt (**27. ábra**) a legvalószínűbbnek a találatok közül, melynek összesen 10 izomerje szerepelt a Scifinder által adott 27 elemű listában. További tényezők is szerepet játszottak abban, hogy azt feltételezzem, a 4. komponens a Peloruside A. Nevezetesen az, hogy a listában szereplő egy másik, szignifikánsan megkülönböztető metabolit összegképlete C₂₆H₄₇O₁₁-nek ((M+H)⁺) bizonyult, amely megegyezik a Peloruside A egyik rokon szerkezete, a Peloruside B összegképletével (egy metil csoporttal különbözik az előbbtől). A Peloruside B ugyancsak szerepelt a DNP adatbázisban és ugyancsak az önmeddő fajtában szignifikánsan túlexpresszáldott, időbeli növekedést is mutatva. MS¹ spektruma a **28. ábrán** látható.



27. ábra: Peloruside A gyűrűs (a) és nyílt láncú formája (b).



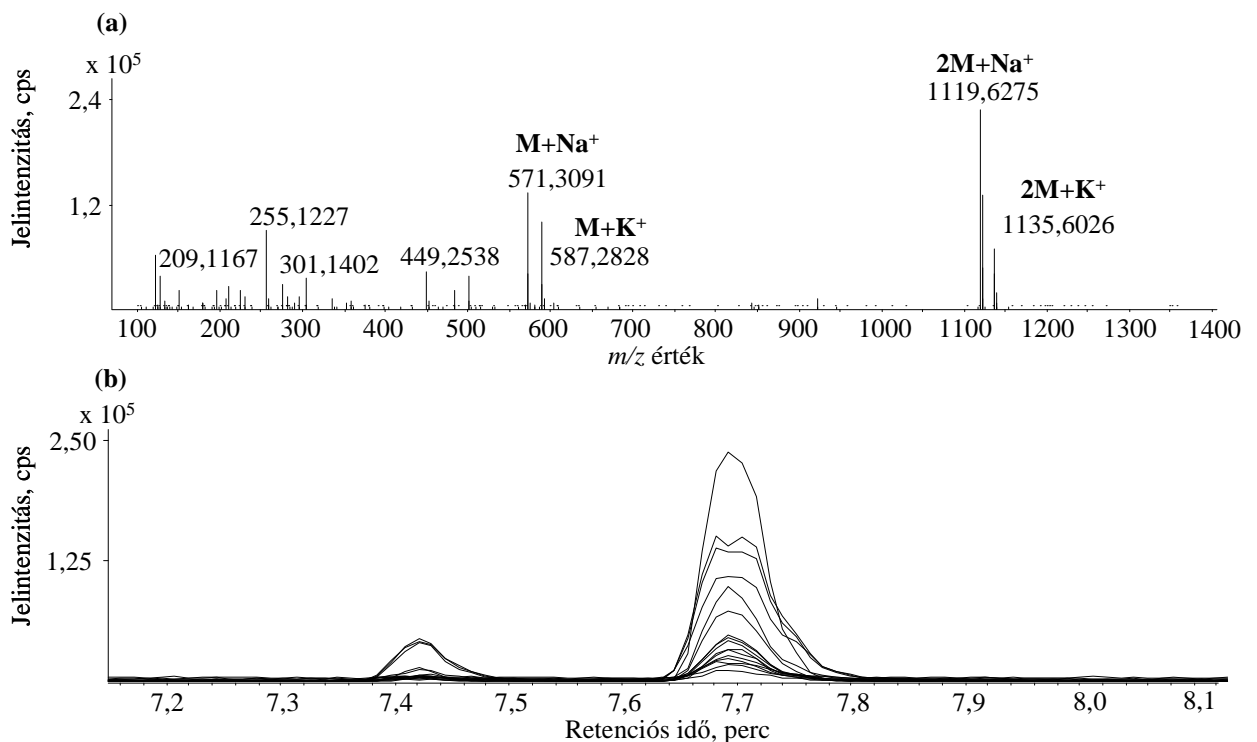
28. ábra: Az *I. komponens* MS¹ spektrumában látható m/z 271,2262 in-source fragmens és a *4. komponens* MS¹ spektrumában található m/z 285,2429 in-source fragmens közötti 14 Da értékű különbség alapján feltételezhető az egy metil-csoportbeli különbség.

Ismert, hogy az önmeddő kajszibibékben a pollentömlők fejlődése a bibeszál alsó negyedében megtorpan, megakadályozva ezzel a pollenszemek petesejthez való eljutását, ezáltal a megtermékenyítést (Halász és mtsai., 2007; Kodad és mtsai., 2013; Milatović és Nikolić, 2007). Mivel a feltételezett Peloruside A-t az önmeddő fajtában találtam, úgy gondoltam, hogy az ismert mikrotubulus stabilizáló hatás magyarázatot adhat a pollentömlők növekedésének megtorpanására. Hasonló hatás állhat a háttérben a Peloruside A tumorellenes hatásának is, melyet korábban emberi petefészek daganatsejteken és rágcsálók T sejtjein végzett kísérletekkel bizonyítottak (Wilmes és mtsai., 2011). A Peloruside A nM mennyiségben van jelen a *Mycale hentscheli* tengeri szivacs sejtjeiben, amelyet először Miller és mtsai. (2010) azonosítottak. Bár Begaye és mtsai. (2011) kimutatták, hogy léteznek egyes, Peloruside A-ra rezisztens sejtvonalak,

melyek pontmutációt tartalmazó I. osztályú β -tubulin génekkel rendelkeznek, a peloruside-rokon szerkezetek mégis ígéretes daganatellenes aktivitást mutatnak.

Mivel a komponenst eddig csak meglehetősen eltérő szervezetben mutatták ki, elrugaszkodottnak tűnhet az a feltételezés, hogy egy tengeri szivacsban és kajsziban is megtalálható ugyanaz a komponens. Ehhez hasonló esetre azonban találunk egyéb példát is az élővilágban, pl. a feromonok esetében, hiszen a rendszertani besorolásban egymástól távol eső élőlényekben (pl. rovarok és emlősök esetén is) ugyanúgy a nemi hormonok szerepét töltik be.

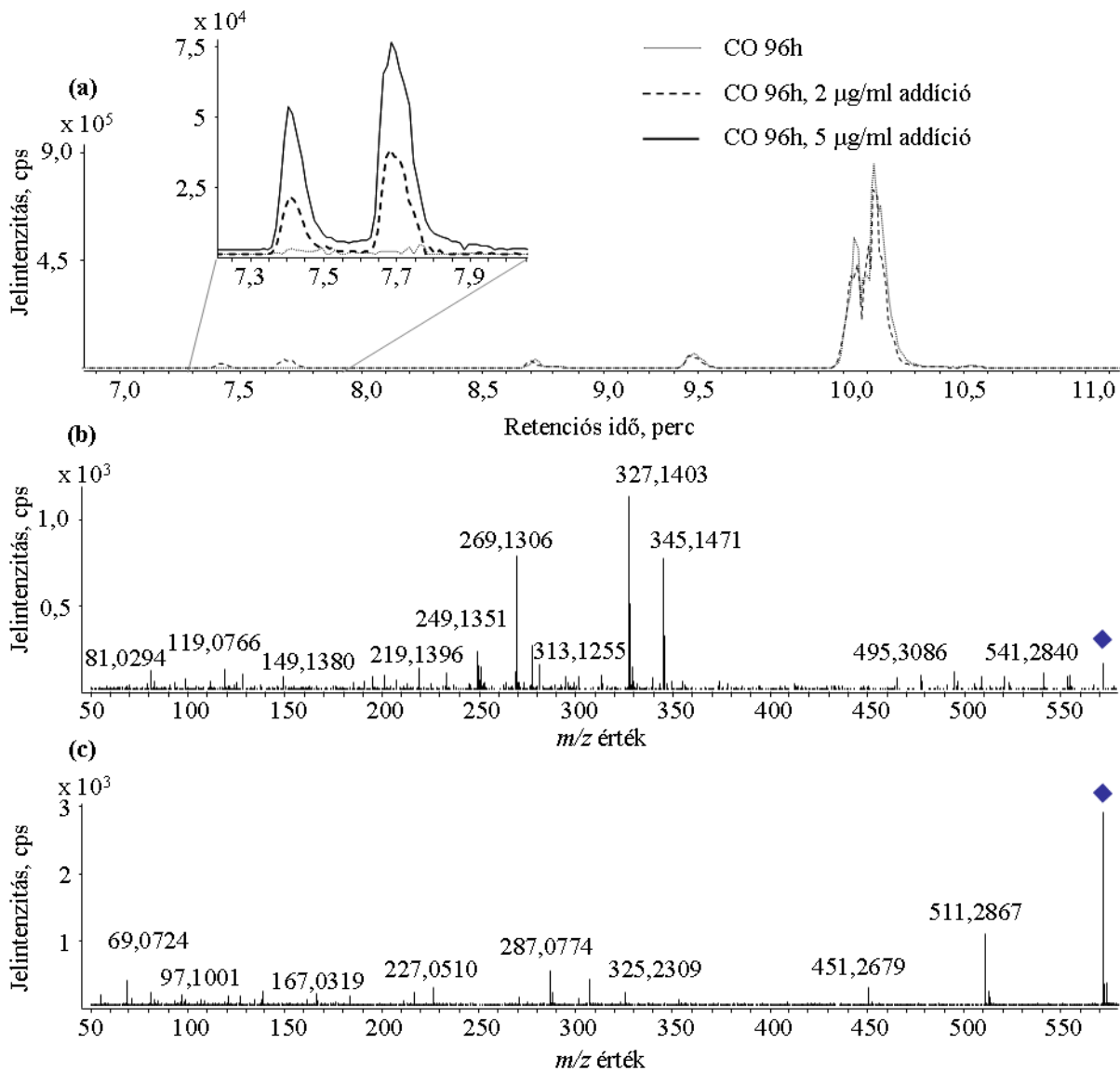
Mindkét forrásból kapott Peloruside A mintát ugyanabba a kromatográfiás rendszerbe injektáltam és retenciós idejét, MS^1 és MS^2 tömegspektrumát összehasonlítottam a 4. komponensével. A 4. komponens fő m/z értékei 549,3266, 571,3091 és 587,2829 voltak, melyek a protonált forma, a nátrium addukt, illetve kálium addukt tömegének felelnek meg. Ezeken felül a **26. ábrán** látható tömegspektrumon jónéhány in-source fragmens is megfigyelhető. Mindkét standard oldatot etanolban oldottam fel, és mindkét esetben két izomert figyeltem meg 7,4 és 7,7 perc retenciós időnél m/z 571,3091 ($M+Na^+$), m/z 587,2828 ($M+K^+$), m/z 1119,6275 ($2M+Na^+$) és m/z 1135,6026-os ($2M+K^+$) értékeknél, amint az a **29 (a). ábrán** látható.



29. ábra: Peloruside A standard vegyület MS^1 spektruma (a) és a hozzá tartozó ionok EIC kromatogramjai (b).

A következő lépésben az CŐ 96h órás mintákat 2 és 5 $\mu\text{g/ml}$ standard oldattal addicionáltam, hogy kizárjak bármilyen, mátrixból érkező hatást, amely esetleg befolyásolhatja a Peloruside A konformációját és amely az eltérő, a mintánál 10,1 perces retenciós időt okozhatja.

Bár az addíciónált mintákban is csak 7,4 és 7,7 percnél jelentkezett jelintenzitás növekedés, MS² kísérleteket is végeztem, hogy biztosan kiderítsem, a 4. komponens nem a feltételezett Peloruside A. A CID fragmentálás során a protonált forma hiányában a nátrium adduktot választottam ki fragmentálásra. A kapott tömegspektrumok és kromatogramok a **30. ábrán** figyelhetők meg.



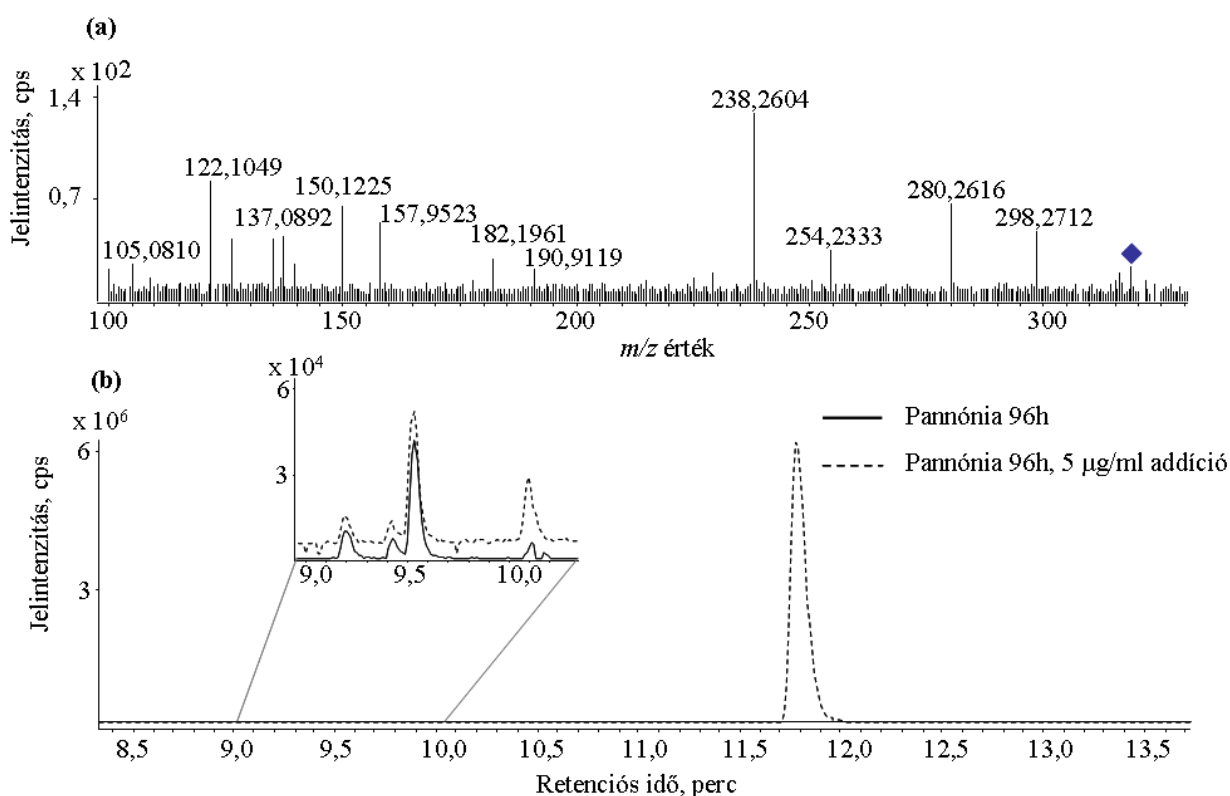
30. ábra: (a) A 2 és 5 µg/ml Peloruside A-val adalékolt, illetve az addíció nélküli minta kromatogramja. A Peloruside A standard (b) és a 4. komponens Na adduktjának MS² spektrumai (c). A kék rombusz jelzi a prekursor iont.

A megfigyelések alapján egyértelmű, hogy a keresett komponens nem a Peloruside A, annak ellenére, hogy a pontos tömeg, izotopológ eloszlás, összegképlet, a domináns nátrium addukt azonossága és a Peloruside A ismert mikrotubulus stabilizáló hatása alapján az azonosság feltételezése kellően alá volt támasztva. A sok hasonlóság alapján azonban okom van feltételezni, hogy az 1. és 4. komponens is a poliketid vázú makrolidek csoportjába tartozik, a

Peloruside rokon szerkezeteihez hasonló hatással bírnak. A Peloruside A, az 1. és 4. komponens további, MS¹ és MS² tömegspektruma a mellékletben (M4-7. ábra) található.

Az F2 főkomponens második legszignifikánsabb elemét, az 5. komponest is megvizsgáltam, mivel azonban a frontban eluálódott és alacsony intenzitású volt, nem próbáltam meg azonosítani.

A harmadik legszignifikánsabb a 7. komponens volt. Összegképlete az izotopológ eloszlás alapján C₁₈H₃₇NO₃ -nak adódott (elméleti (M+H)⁺ C₁₈H₃₈NO₃, elméleti *m/z* 316,2846, Δ=0,04 ppm, MFG score=99,39), amely szerint az adatbázisos keresést végeztem (további lehetséges összegképletek C₁₉H₄₀OS, C₁₇H₃₈N₃P, C₁₄H₃₃N₇O, C₁₂H₃₂N₁₀, C₁₆H₃₆N₄O₂ MFG score értékei<82). A keresés során heptadecén és oktadecén alkohol származékokat, Leptophylin A-t, Prosopine-t és mirisztinsav-dietanolamidot találtam. MS² spektrum, in-source fragelemek, illetve egyéb intenzív addukt nem volt jelen az MS spektrumokban, ami további információt közölt volna a komponensről. A találatok közül a mirisztinsav-dietanolamidból volt lehetőségem standardot beszerezni, mert az kereskedelmi forgalomban is elérhető.



31. ábra: (a) Mirisztinsav-dietanolamid MS¹ spektruma és az addicionálási kísérletek kromatogramjai (b). A kék rombusz jelzi a prekursor iont.

A standard oldatot etanolban oldottam fel és a már ismert kromatográfiai rendszerbe injektáltam. A mirisztinsav-dietanolamid *m/z* 316,2850 értéknél, 11,8 perces retenciós időnél volt megfigyelhető (**31. ábra**). Ezen kívül az öntermékenyített bibemintát (Pannónia 96h) 5

$\mu\text{g/ml}$ standard oldattal addicionáltam, amely azonban nem a 7. komponens 9,5 perces retenció idejénél eluálódott.

A standard retenció ideje eltér a 7. komponensétől, ami egyértelműen jelzi, hogy a két komponens nem egyezik meg.

A többi megkülönböztető komponenst nem próbáltam meg MS^2 kísérletekkel azonosítani, leginkább alacsony intenzitásuk és az ezzel együtt járó pontatlan izotopológ eloszlásból fakadó kétséges összegképlet meghatározás miatt.

Publikálási tevékenység:

Lénárt, J.; Hegedűs, A.; Halász, J. (2011): Gyümölcsfák önmeddőségének genetikai háttere. Kertgazdaság, 43 (3):87-93.

Hegedűs, A.; Lénárt, J.; Halász J. (2012) Review of sexual incompatibility in tree fruit species: molecular interactions and evolutionary dynamics. Biol. Plantarum, 56 (2), pp. 201-209

Lénárt, J.; Gere, A., Halász, J., Dernovics, M., Hann, S., Hegedűs, A. (2014) LC-MS based metabolic fingerprinting of apricot pistils after self-compatible and self-incompatible pollinations, Publikálás alatt

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. *Lactobacillus casei* által termelt fenhexamid eredetű xenobiotikumok keresése kapcsán egy klór-tartalmú komponensek felismerésére alkalmas algoritmust hoztam létre, amely beállításait optimáltam. A kialakított algoritmus alkalmazhatóságát 17, biológiai mátrixba addicionált klór-tartalmú peszticiddel bizonyítottam.

2. Az algoritmus megfelelő beállításainak köszönhetően a baktérium felülúszójában sikerült klór-tartalmú komponenseket kimutatnom. A baktérium felülúszójában megjelenő fenhexamid-*O*-glükózid vegyület egyértelmű azonosítása alapján bebizonyítottam, hogy a növényeknél már ismert detoxikációs útvonal, a glikozilálás *L. casei* esetében is lehetséges. Az egyértelműen azonosított fenhexamid-*O*-glükózid mellett egy másik, fenhexamid eredetű metabolitról van okom feltételezni, hogy a fenhexamid egy másik glikokonjugátuma.

3. Metabolomikai ujjlenyomatkészítés alkalmazásával vizsgáltam a kajszi virágaiban lejátszódó önmeddőségi reakciókat. A kísérlettervezés során az öntermékenyülő/önmeddő kapcsolat és a kajszi bibék megporzása után eltelt idő szerint alkottam meg a megkülönböztetni kívánt csoportokat. Ennek eredményeképp sikerült egyértelműen megkülönböztetnem egymástól a mintacsoportokat mind genotípus, mind megporzási idő szerint, amely azt bizonyítja, hogy az önmeddőség metabolomikai vizsgálatának alkalmazása releváns választás és értékes információval járul hozzá a mechanizmus megértéséhez.

4. LC-MS alapú metabolomikai ujjlenyomatkészítés segítségével 15, az önmeddőségi reakciók kimenetele szempontjából szignifikáns metabolitot határoztam meg. Ezek közül a megkülönböztetéshez legnagyobb mértékben hozzájáruló komponenst illetően azt a következtetést vontam le, hogy a poliketid vázú makrolidek csoportjába tartozik. E komponens típusának feltételes azonosítását a keresett komponenshez hasonló Peloruside A ismert mikrotubulus stabilizáló hatása és az önmeddőséghez vezető, korábban feltárt fiziológiai ismeretek közötti erős egyezőségre alapoztam.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

7.1 *Lactobacillus casei* által termelt fenhexamid eredetű klór-tartalmú xenobiotikumok metabolomikai feltérképezése

A fenhexamid-*O*-glükózid *Lactobacillus casei* baktériumok általi előállítását egyértelműen sikerült bebizonyítani MRS tápközegben. Horváth diplomamunkájából (Horváth, 2013) β -glükózidázal történő enzimkezelés segítségével az is beigazolódott, hogy az *L. casei* tenyészetekben a cukor egység β -térállású. Ezek alapján a fenhexamidtól hidrofílebb fenhexamid-*O*-glükózid és a detektált, feltételezhetően glükózid konjugátum tejsavbaktériumok általi előállítása hasznos információként szolgálhat a fenhexamid MRL értékének, illetve bélrendszerben való felszívódásának értékelésében. Annak bebizonyítására azonban mindenképpen további *in-vivo/in-vitro* vizsgálatok szükségesek, hogy kiderüljön, ez a bélrendszerben is valójában megtörténik-e.

A peszticidek általános bakteriális biodegradációs útvonalai specifikus és nem specifikus enzimaktivitást (pl. hidroláz, mono- és dioxigenáz) igényelnek, míg a most tapasztalt glikoziláció nem tartozik a tipikus bakteriális detoxikációs útvonalakhoz. Rác szakdolgozatának eredményei (Rác, 2014) is azt támasztják alá, hogy ez a fajta detoxikációs útvonal specifikusan a fenhexamidra vonatkozik és nem lehet általánosan más, szabad hidroxil-csoportot tartalmazó peszticidek esetére adaptálni, mint ahogy az a metconazole, tebuconazole és haloxyfop esetében beigazolódott.

7.2 A kajszai önmeddőségének vizsgálata metabolomikai ujljenyomatkészítéssel

A *Prunus* nemzetségbe tartozó gyümölcsfajok pollentömlőiben az SFB fehérjék és a pollentömlőkbe belépő bibe S-RN-ázok között lejátszódó specifikus felismerés vezet az önmeddőség kialakulásához (Entani és mtsai., 2003; McClure és mtsai., 1989; Sonneveld és mtsai., 2005). A pollentömlőkben az RNS-ek lebontása a fehérjebioszintézis megszűnéséhez vezet, a pollentömlő növekedésének megtorpanásához vezető fiziológiai folyamatok számos részlete azonban nem kellően tisztázott.

Az LC-MS alapú metabolomikai ujljenyomatkészítés fő hátránya a komponensazonosítás, leginkább a jelenlegi adatbázisokban elérhető komponensek limitált száma miatt. Bár, legfőképpen éppen az említett probléma miatt, nem sikerült egyértelműen azonosítanom az önmeddő/öntermékenyülő kapcsolat kialakulásában feltehetően szerepet játszó 1. és 4. komponenseket, a munkám alapján valószínűsíthető, hogy a kulcskomponensek között peloruside-hoz hasonló vegyületek is jelen lehetnek. Ezek a komponensek túlnyomórészt az önmeddő 'Ceglédi óriás' (S_8S_9) bibékben fejeződnek ki, illetve mennyiségük a pollentömlők növekedésének megfelelően időben egyre nagyobb lesz. Ráadásul ezeket a komponenseket nem

találtam meg (illetve csak nagyságrendekkel kisebb mennyiségben) a ‘Ceglédi óriás’ megporzatlan bibéiben.

A Peloruside A-ról, az új-zélandi tengeri szivacsban talált egyik másodlagos anygacsere-termékről ismert, hogy mikrotubulus-stabilizáló hatással rendelkezik, amit a tubulin dimerekhez való kötődés révén idéz elő (Miller és mtsai., 2010). A *Papaver* típusú GSI rendszer esetén az inkompatibilis pollentömlőkben bekövetkezik az aktin mikrofilamentumok depolimerizálódása, ami kiváltja a mikrotubulusok depolimerizálódását is (Poulter és mtsai., 2008). Érdekes módon néhány proteomikai tanulmány arról számolt be, hogy egyes aktinmolekulák a kajszibibékben is felhalmozódnak, mi több kizárólag az inkompatibilis megporzás során (Feng és mtsai., 2009). Továbbá, a redukált *S*-RN-ázok aktinokhoz való kötődését élesztő kettős hibrid rendszer használatával igazolták *P. avium* pollentömlőben (Tao, szóbeli közlés), így elképzelhető, hogy az *S*-RN-ázok megzavarják az aktinmolekulák biológiai funkcióját.

Ha a *Papaver* GSI-hez hasonlóan a *Prunus* gyümölcsfákban is hasonló kapcsolatot feltételezünk a mikrofilamentumok és a mikrotubulusok degradációja között, a mikrotubulusoknak a peloruside-okhoz hasonló vegyületekkel történő megvédése feltételezhető a pollentömlők aktivitásának megőrzése érdekében. A mikrofilamentumokkal szemben ugyanis a degradált mikrotubulusok polimer szerkezete nem áll helyre a pollentömlőben (Poulter és mtsai., 2008), így a védekezés egyetlen lehetősége degradációjuk hatékony gátlása.

Néhány peloruside-rokon szerkezetről ismert, hogy a Peloruside A-hoz hasonló aktivitással rendelkezik (Miller és mtsai., 2010), így elképzelhető, hogy az 1. és 4. komponens az önmeddő pollentömlőkben akkumulálódva ilyen vagy ehhez hasonló fiziológiai következményeket idéz elő. Valószínűleg ez egy stresszre adott reakció, az intakt sejtváz megóvása érdekében, ami elengedhetetlen a pollen általi megtermékenyítéshez, a pollentömlő növekedéséhez (Bove és mtsai., 2008; Taylor és Hepler, 1997). Az önmeddő és öntermékenyülő megporzást követő metabolomikai vizsgálattal az volt a célom, hogy fényt derítsek a pollentömlő-növekedés kevésbé ismert tényezőire és az inkompatibilitási reakció saját/idegen felismerési folyamatát követő molekuláris eseményekben résztvevő komponensekre.

Bár mindenképpen szükségesek további vizsgálatok a kérdés tisztázására, így a felelős komponensek egyértelmű azonosítására és önmeddőségi reakciókban betöltött szerepük megismerésére, munkám során sikerült olyan metabolitokat találnom, amelyek e reakciók kimenetelét illetően feltételezhetően nagy jelentőséggel bírnak, és jelenlétük a rendelkezésre álló genetikai és proteomikai információn túl segíthet a teljes mechanizmus megértésében.

8. SUMMARY

8.1 Metabolomic investigation of xenobiotics of fenhexamid origin produced by *Lactobacillus casei*

The production of fenhexamid-*O*-glucoside in MRS broth by *Lactobacillus casei* was unambiguously identified. In the thesis of Horváth (Horváth, 2013) with the aim of enzymatic digestion it was successfully proved that the carbohydrate moiety has β spatial position in the case of *L. casei*. The more hydrophilic fenhexamid-*O*-glucoside and the other putative glucoside conjugate produced by *lactobacilli* can serve as useful information in the evaluation of the absorption of fenhexamid in the intestinal system and the determination of the MRL value. However, to deduce the possibility of the reaction in the intestinal system further *in-vivo/in-vitro* examinations are required.

The general bacterial biodegradation pathways of pesticides comprise specific and non-specific, e.g., hydrolase, mono- and dioxygenase enzymatic activities, while the glycosilation observed in this work is not the part of a typical detoxication pathway. The results of Rácz (Rácz, 2014) also prove that this kind of bacterial detoxication pathway is specific to fenhexamid and cannot be adapted to other pesticides having free hydroxyl functional groups as it was confirmed in the case of metconazole, tebuconazole and haloxyfop.

8.2 Metabolomic fingerprinting of self-incompatibility reactions in apricots

The self-incompatibility reaction in pollen tubes of *Prunus* fruit trees is mediated by the specific recognition between pollen SFBs and pistil *S*-RNases that enter the pollen tube (Entani et al., 2003; McClure et al., 1989; Sonneveld et al., 2005). In incompatible pollen tubes, RNA degradation may result in the cessation of protein biosynthesis but far less is known about the downstream physiological reactions leading to the growth arrest of incompatible pollen tubes. Compound identification is a major drawback of LC-MS based metabolic fingerprinting experiments, because the number of available metabolites in the recent databases is still limited. Although, the unambiguous identification of *Compounds 1* and *4* was not possible because of the limited availability of specific standard compounds, our study revealed that peloruside-like compounds predominantly accumulate in self-pollinated pistils of the self-incompatible apricot cultivar ‘Ceglédi óriás’ (*S₈S₉*) and their accumulation increases throughout the first 96 hours of pollen tube growth. In addition, such compounds were not detected (or had significantly lower abundance) in ‘Ceglédi óriás’ pistils without pollination.

Peloruside A, a secondary metabolite of a New Zealand marine sponge was found to have a microtubule stabilizing effects through binding to the tubulin dimmers (Miller et al., 2010). In the *Papaver*-type GSI system, the massive depolymerisation of actin microfilaments upon SI

stimulus is evident, which then rapidly triggers depolymerisation of microtubules (Poulter et al., 2008). Interestingly, proteomic studies revealed that several actins were detected to accumulate in apricot pistils only after incompatible pollination (Feng et al., 2009). In addition, binding of the reduced *S*-RNase to actins in *P. avium* pollen tubes was shown by yeast-two-hybrid analysis and hence *S*-RNases may disrupt actin dynamics. If a link between microfilament and microtubule degradation is presumed in *Prunus* similarly to the *Papaver* GSI response, a strategy to protect microtubules with specific compounds like pelorusides seems indispensable for maintaining pollen tube activity since it was also shown that disintegrated microtubules do not reorganise later (Poulter et al., 2008).

Several peloruside congeners and analogues were shown to have similar bioactivity to Peloruside A (Miller et al., 2010) and hence *Compounds 1* and *4* that are accumulating in incompatible pollen tubes may be associated with similar physiological consequences. This might be a stress response to maintain intact cytoskeleton that is essential for pollen germination and tip growth (Bove et al., 2008; Taylor and Hepler, 1997). The metabolome analysis of pistils after incompatible and compatible pollination may shed light on the less known aspects of pollen tube growth and downstream reactions of the self/non-self recognition in *Prunus* GSI system.

However, further experiments are required for the no-doubt structural identification of such compounds for verification of their role in sexual incompatibility induced pollen tube arrest, our study revealed putative metabolites significantly contributing to the sexual compatibility reactions and hence besides genetic and proteomic studies our observations can help to get closer to the understanding of the underlying physiological reactions.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbate, C., Borzì, D., Caboni, P., Baglieri, A., Gennari, M., 2007. Behavior of fenhexamid in soil and water. *J. Environ. Sci. Health - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 42, 843–849. doi:10.1080/03601230701555088
- Abou-Arab, A.A., 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food Chem. Toxicol.* 40, 33–41. doi:10.1016/S0278-6915(01)00090-4
- Agilent Technologies, Inc., 2012. Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System Concepts Guide. [http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G3335-90142_TOF_QTOF_Concepts .pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G3335-90142_TOF_QTOF_Concepts.pdf)
- Aharoni, A., De Vos, C.H.R., Verhoeven, H.A., Maliepaard, C.A., Kruppa, G., Bino, R., Goodenowe, D.B., 2002. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS J. Integr. Biol.* 6, 217–234.
- Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., 2003. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat. Biotechnol.* 21, 692–696. doi:10.1038/nbt823
- Anderson, Brumhard, Ditzgen, Reiner, 1999. Metabolism of fenhexamid (KBR 2738) in plants, animals, and the environment. *Pflanzenschutz Nachrichten-Bayer- Engl. Ed.* 52, 227–251.
- Angioni, A., Schirra, M., Garau, V.L., Melis, M., Tuberoso, C.I.G., Cabras, P., 2004. Residues of azoxystrobin, fenhexamid and pyrimethanil in strawberry following field treatments and the effect of domestic washing. *Food Addit. Contam.* 21, 1065–1070. doi:10.1080/02652030400010066
- Awad, H., Khamis, M.M., El-Aneed, A., 2015 .Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Appl. Spectrosc. Rev.* 50, 158-175. doi: 10.1080/05704928.2014.954046
- Ayana, I.A.A.A., El Deen, A.A.G., El-Metwally, M.A., 2011. Behavior of certain lactic acid bacteria in the presence of pesticides residues. *Int. J. Dairy Sci.* 6, 44–57. doi:10.3923/ijds.2011.44.57
- Az élelmiszerek vegyi szennyezettségéről 17/1999. (VI. 16.) EüM rendelet | Jogszabályok az élelmiszer-gazdaságban, 1999.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920. doi:10.1126/science.1104816
- Begaye, A., Trostel, S., Zhao, Z., Taylor, R.E., Schriemer, D.C., Sackett, D.L., 2011. Mutations in the β -tubulin binding site for peloruside A confer resistance by targeting a cleft significant in side chain binding. *Cell Cycle* 10, 3387–3396. doi:10.4161/cc.10.19.17706
- Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Héberger, K., 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *J. Chromatogr. A* 1158, 196–214. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.024
- Békefi, E., 2013. „Egy gyakran használt peszticid, a fenhexamid hatásának vizsgálata probiotikus *Lactobacillus* törzsekre”. Szakdolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I.A., Van Ommen, B., Smilde, A.K., 2006. Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal. Chem.* 78, 567–574. doi:10.1021/ac051495j
- Bino, R.J., Hall, R.D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B.J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M.H., Trethewey, R.N., Lange, B.M., Wurtele, E.S., Sumner, L.W., 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.* 9, 418–425. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.004
- Bollina, V., Kumaraswamy, G., Kushalappa, A.C., Choo, T., Dion, Y., Rioux, S., Faubert, D., Hamzehzarghani, H., 2010. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Mol. Plant Pathol.* 11, 769–782. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00643.x
- Bollina, V., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., Rioux, S., 2011. Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant Mol. Biol.* 77, 355–370. doi:10.1007/s11103-011-9815-8
- Bove, J., Vaillancourt, B., Kroeger, J., Hepler, P.K., Wiseman, P.W., Geitmann, A., 2008. Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Plant Physiol.* 147, 1646–1658. doi:10.1104/pp.108.120212

- Bowers, J., Hughes, E., Skill, N., Maluccio, M., Raftery, D., 2014. Detection of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients: Biomarker discovery by LC-MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 966, 154–162. doi:10.1016/j.jchromb.2014.02.043
- Brindle, J.T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J.K., Bethell, H.W.L., Clarke, S., Schofield, P.M., McKilligin, E., Mosedale, D.E., Grainger, D.J., 2002. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat. Med.* 8, 1439–1444. doi:10.1038/nm802
- Broothaerts, W., Janssens, G.A., Proost, P., Broekaert, W.F., 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27, 499–511. doi:10.1007/BF00019317
- Bunk, B., Kucklick, M., Jonas, R., Münch, R., Schobert, M., Jahn, D., Hiller, K., 2006. MetaQuant: A tool for the automatic quantification of GC/MS-based metabolome data. *Bioinformatics* 22, 2962–2965. doi:10.1093/bioinformatics/btl526
- Cabras, P., Farris, G.A., Pinna, M.V., Pusino, A., 2004. Behavior of a fenhexamid photoproduct during the alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8053–8056.
- Cachi, A.M., Wünsch, A., 2011. Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Exp. Bot.* 62, 1847–1856. doi:10.1093/jxb/erq374
- Castrillo, J.I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S.J., Oliver, S.G., 2003. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 62, 929–937. doi:10.1016/S0031-9422(02)00713-6
- Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Jirattananangri, W., Van de Wiele, T., 2012. Influence of encapsulated probiotics combined with pressurized longan juice on colon microflora and their metabolic activities on the exposure to simulated dynamic gastrointestinal tract. *Food Res. Int.* 49, 133–142. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.033
- Chan, E.C.Y., Koh, P.K., Mal, M., Cheah, P.Y., Eu, K.W., Backshall, A., Cavill, R., Nicholson, J.K., Keun, H.C., 2009. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J. Proteome Res.* 8, 352–361. doi:10.1021/pr8006232
- Chaves, I., Alves, M., Carrilho, D., Duque-Magalhães, M.C., Ricardo, C.P., Regalado, A.P., 2011. Protein changes during programmed cell death in tobacco. *Biol. Plant.* 55, 153–158. doi:10.1007/s10535-011-0021-y
- Choonia, H.S., Lele, S.S., 2011. β -Galactosidase release kinetics during ultrasonic disruption of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented Eleusine coracana. *Food Bioprod. Process.* 89, 288–293. doi:10.1016/j.fbp.2010.08.009
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N., 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4142–4147.
- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Séralini, G.-E., Panoff, J.-M., 2012. Effects of roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr. Microbiol.* 64, 486–491. doi:10.1007/s00284-012-0098-3
- Cruz-García, F., Hancock, C.N., McClure, B., 2003. S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.* 54, 123–130. doi:10.1093/jxb/54.380.123
- Cruz-García, F., Nathan Hancock, C., Kim, D., McClure, B., 2005. Styolar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J.* 42, 295–304. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02375.x
- Davis, C.D., Milner, J.A., 2009. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J. Nutr. Biochem.* 20, 743–752. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.001
- DeLong, E.F., Pace, N.R., 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50, 470–478.
- Deng, C., Liu, N., Gao, M., Zhang, X., 2007. Recent developments in sample preparation techniques for chromatography analysis of traditional Chinese medicines. *J. Chromatogr. A* 1153, 90–96. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.081
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51–78. doi:10.1002/mas.20108
- Dettmer, K., Hammock, B.D., 2004. Metabolomics - A new exciting field within the “omics” sciences. *Environ. Health Perspect.* 112, A396–A397.

- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
- European Food Safety Authority; Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for fenhexamid in currants and beans with pods EFSA J 2013;11(2):3110.[25pp.]doi:10.2903/j.efsa.2013.3110.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14863–14868. doi:10.1073/pnas.95.25.14863
- Eldik, G.J. van, Ruiter, R.K., Colla, P.H.W.N., Herpen, M.M.A. van, Schrauwen, J. a. M., Wullems, G.J., 1997. Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.* 33, 923–929. doi:10.1023/A:1005749913203
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F.-S., Isogai, A., Takayama, S., 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* 8, 203–213. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00626.x
- Eriksson, L., Antti, H., Gottfries, J., Holmes, E., Johansson, E., Lindgren, F., Long, I., Lundstedt, T., Trygg, J., Wold, S., 2004. Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm). *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 419–429. doi:10.1007/s00216-004-2783-y
- EUR-Lex - 31991L0414 - Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal L 230 , 19/08/1991 P. 0001 - 0032
- European Parliament, E. C., Regulation (EC) No. 396/2005, 2005. REGULATION (EC) NO 396/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- FAO, 2005. Pesticide residues in food - 2005 .URL:http://www.fao.org/docrep/009/a0209e/a0209e0c.htm#bm12 (elérés: 2014.10. 09).
- Feng, J., Chen, X., Wu, Y., Liu, W., Liang, Q., Zhang, L., 2006. Detection and transcript expression of S-RNase gene associated with self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Mol. Biol. Rep.* 33, 215–221. doi:10.1007/s11033-006-0011-x
- Feng, J.R., Chen, X.S., Yuan, Z.H., Zhang, L.J., Ci, Z.J., Liu, X.L., Zhang, C.Y., 2009. Primary molecular features of self-incompatible and self-compatible F 1 seedling from apricot (*Prunus armeniaca* L.) Katy x Xinshiji. *Mol. Biol. Rep.* 36, 263–272. doi:10.1007/s11033-007-9175-2
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–171. doi:10.1023/A:1013713905833
- Gao, P., Lu, C., Zhang, F., Sang, P., Yang, D., Li, X., Kong, H., Yin, P., Tian, J., Lu, X., Lu, A., Xu, G., 2008. Integrated GC-MS and LC-MS plasma metabonomics analysis of ankylosing spondylitis. *Analyst* 133, 1214–1220. doi:10.1039/b807369d
- Geier, F.M., Want, E.J., Leroi, A.M., Bundy, J.G., 2011. Cross-platform comparison of caenorhabditis elegans tissue extraction strategies for comprehensive metabolome coverage. *Anal. Chem.* 83, 3730–3736. doi:10.1021/ac2001109
- Golden, R., Kimbrough, R., 2009. Weight of evidence evaluation of potential human cancer risks from exposure to polychlorinated biphenyls: An update based on studies published since 2003. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 299–331. doi:10.1080/10408440802291521
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, C.N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T.E., Cruz-Garcia, F., McClure, B., 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439, 805–810. doi:10.1038/nature04491
- Goldway, M., Shai, O., Yehuda, H., Matityahu, A., Stern, R.A., 1999. “Jonathan” apple is a lower-potency pollenizer of “Topred” than “Golden Delicious” due to partial S-allele incompatibility. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74, 381–385.
- Goldway, M., Stern, R., Zisovich, A., Raz, A., Sapir, G., Schnieder, D., Nyska, R., 2012. The self-incompatibility fertilization system in rosaceae: Agricultural and genetic aspects, *Acta Hort. (ISHS)* 967:77-82
- Gonzalez, B., François, J., Renaud, M., 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347–1356. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1347::AID-YEA176>3.0.CO;2-O

- Good-Avila, S.V., Mena-Alí, J.I., Stephenson, A.G., 2008. Genetic and Environmental Causes and Evolutionary Consequences of Variations in Self-Fertility in Self Incompatible Species, in: *Self-Incompatibility in Flowering Plants*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33–51.
- Griffiths, W.J., 2008. Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling. *Royal Society of Chemistry*. doi:10.1039/9781847558107
- Halász, J., Pedryc, A., Hegedus, A., 2007. Origin and dissemination of the pollen-part mutated SC haplotype which confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca*). *New Phytol.* 176, 792–803. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02220.x
- Hall, A., 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279, 509–514. doi:10.1126/science.279.5350.509
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
- Hiller, K., Hangebrauk, J., Jäger, C., Spura, J., Schreiber, K., Schomburg, D., 2009. Metabolite detector: Comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis. *Anal. Chem.* 81, 3429–3439. doi:10.1021/ac802689c
- Horvai, A., Borosy, P., Héberger, K., Kolossváry, I., Lengyel, A., Paksy, L., Rajkó, R., Szepesváry, P., 2001. Sokváltozás adatelemzés (kemometria). Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Horváth, T., 2013. „Egy *Lactobacillus* eredetű xenobiotikum-származék, a fenhexamid-O-glükozid kinyerése és vizsgálata”. Diplomadolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- Huang, S., Lee, H.S., Karunanandaa, B., Kao, T.H., 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell Online* 6, 1021–1028. doi:10.1105/tpc.6.7.1021
- Hua, Z.-H., Fields, A., Kao, T., 2008. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol. Plant* 1, 575–585. doi:10.1093/mp/ssn032
- Hyung Ko, J., Gyu Kim, B., Joong-Hoon, A., 2006. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 263–268. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00226.x
- Ito, M., 2005. Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.* 118, 61–69. doi:10.1007/s10265-005-0192-8
- Jackson, J.E., 1991. Getting started, in: *A user's guide to principal components*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 4–25.
- Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Boelens, H.F.M., van der Greef, J., Smilde, A.K., 2004. Analysis of longitudinal metabolomics data. *Bioinformatics* 20, 2438–2446. doi:10.1093/bioinformatics/bth268
- Johnson, C.H., Patterson, A.D., Idle, J.R., Gonzalez, F.J., 2012. Xenobiotic metabolomics: Major impact on the metabolome, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*
- Johnson, C.H., Patterson, A.D., Krausz, K.W., Lanz, C., Kang, D.W., Luecke, H., Gonzalez, F.J., Idle, J.R., 2011. Radiation metabolomics. 4. UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics for urinary biomarker discovery in gamma-irradiated rats. *Radiat. Res.* 175, 473–484. doi:10.1667/RR2437.1
- Jonsson, P., Gullberg, J., Nordström, A., Kusano, M., Kowalczyk, M., Sjöström, M., Moritz, T., 2004. A Strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. *Anal. Chem.* 76, 1738–1745. doi:10.1021/ac0352427
- Kachigan, S.K., 1991. *Multivariate Statistical Analysis: A conceptual introduction*, 2nd edition, Radius Press, New York.
- Kajander, K., Myllyluoma, E., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., Sipponen, P., Mattila, I., Seppänen-Laakso, T., Vapaatalo, H., Oreşic, M., Korpela, R., 2009. Elevated pro-inflammatory and lipotoxic mucosal lipids characterise irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 15, 6068–6074. doi:10.3748/wjg.15.6068
- Kawata, Y., Sakiyama, F., Tamaoki, H., 1988. Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* 176, 683–697. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14331.x
- Khosravi-Darani, K., 2010. Research activities on supercritical fluid science in food biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 479–488. doi:10.1080/10408390802248759
- Kim, G.-E., Kang, H.-K., Seo, E.-S., Jung, S.-H., Park, J.-S., Kim, D.-H., Kim, D.-W., Ahn, S.-A., Sunwoo, C., Kim, D., 2012. Glucosylation of the flavonoid, astragaloside by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranase acceptor reactions and characterization of the products. *Enzyme Microb. Technol.* 50, 50–56. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.09.007

- Kind, T., Fiehn, O., 2006. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* 7. doi:10.1186/1471-2105-7-234
- Kitagawa, N., Fischer, S. M., Sana, T., Peterson, D., Darland, E., Li, X., 2009. Improving untargeted differential analysis of mass spectrometric data by recursive feature extraction. *ASMS 2009*.
- Klavins, K., Neubauer, S., Al Chalabi, A., Sonntag, D., Haberhauer-Troyer, C., Russmayer, H., Sauer, M., Mattanovich, D., Hann, S., Koellensperger, G., 2013. Interlaboratory comparison for quantitative primary metabolite profiling in *Pichia pastoris*. *Metabolomics and Metabolite Profiling. Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5159–5169. doi:10.1007/s00216-013-6964-4
- Kmellár, B., Abrankó, L., Fodora, P., Lehotay, S.J., 2010. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam. - Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 1415–1430. doi:10.1080/19440049.2010.490791
- Koch, W., Forcisi, S., Lehmann, R., Schmitt-Kopplin, P., 2014. Sensitivity improvement in hydrophilic interaction chromatography negative mode electrospray ionization mass spectrometry using 2-(2-methoxyethoxy)ethanol as a post-column modifier for non-targeted metabolomics. In press. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.104
- Kodad, O., Halász, J., Hegedüs, A., Messaoudi, Z., Pedryc, A., Socias, R., 2013. Self-(in)compatibility and fruit set in 19 local Moroccan apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 88, 457–461.
- Kumar, A., McClure, B., 2010. Pollen–pistil interactions and the endomembrane system. *J. Exp. Bot.* 61, 2001–2013. doi:10.1093/jxb/erq065
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y., 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50, 29–41. doi:10.1023/A:1016050018779
- Lers, A., Burd, S., Lomaniec, E., Droby, S., Chalutz, E., 1998. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. *Plant Mol. Biol.* 36, 847–856. doi:10.1023/A:1005996515602
- Lénárt, J., Hegedüs, A., Halász, J., 2011. Gyümölcsfák önmeddőségének genetikai háttere. *Kertgazdaság.* 43, 87-93.
- Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017
- Li, H.-B., Jiang, Y., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2007. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 483–488. doi:10.1007/s00216-007-1235-x
- Lin, Y., Schiavo, S., Orjala, J., Vouros, P., Kautz, R., 2008. Microscale LC-MS-NMR platform applied to the identification of active cyanobacterial metabolites. *Anal. Chem.* 80, 8045–8054. doi:10.1021/ac801049k
- Liu, B., Ning, Z., Zhan, Y., Xu, K., Gao, J., 2008. Characterization and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of methanol and supercritical carbon dioxide extracts from leaves of *Adinandra nitida*. *J. Food Biochem.* 32, 431–442. doi:10.1111/j.1745-4514.2008.00159.x
- López, J.L., Marina, A., Vázquez, J., Alvarez, G., 2002. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 141, 217–223. doi:10.1007/s00227-002-0827-4
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A., Kopka, J., 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - Mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24, 732–737. doi:10.1093/bioinformatics/btn023
- Luu, D.T., Qin, X., Laublin, G., Yang, Q., Morse, D., Cappadocia, M., 2001. Rejection of S-heteroallelic pollen by a dual-specific s-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* 159, 329–335.
- Lv, H., 2013. Mass spectrometry-based metabolomics towards understanding of gene functions with a diversity of biological contexts. *Mass Spectrom. Rev.* 32, 118–128. doi:10.1002/mas.21354
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P., 2008. *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edition. Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Malhotra, 2005. *Marketingkutató. Akadémiai Kiadó, Budapest.*

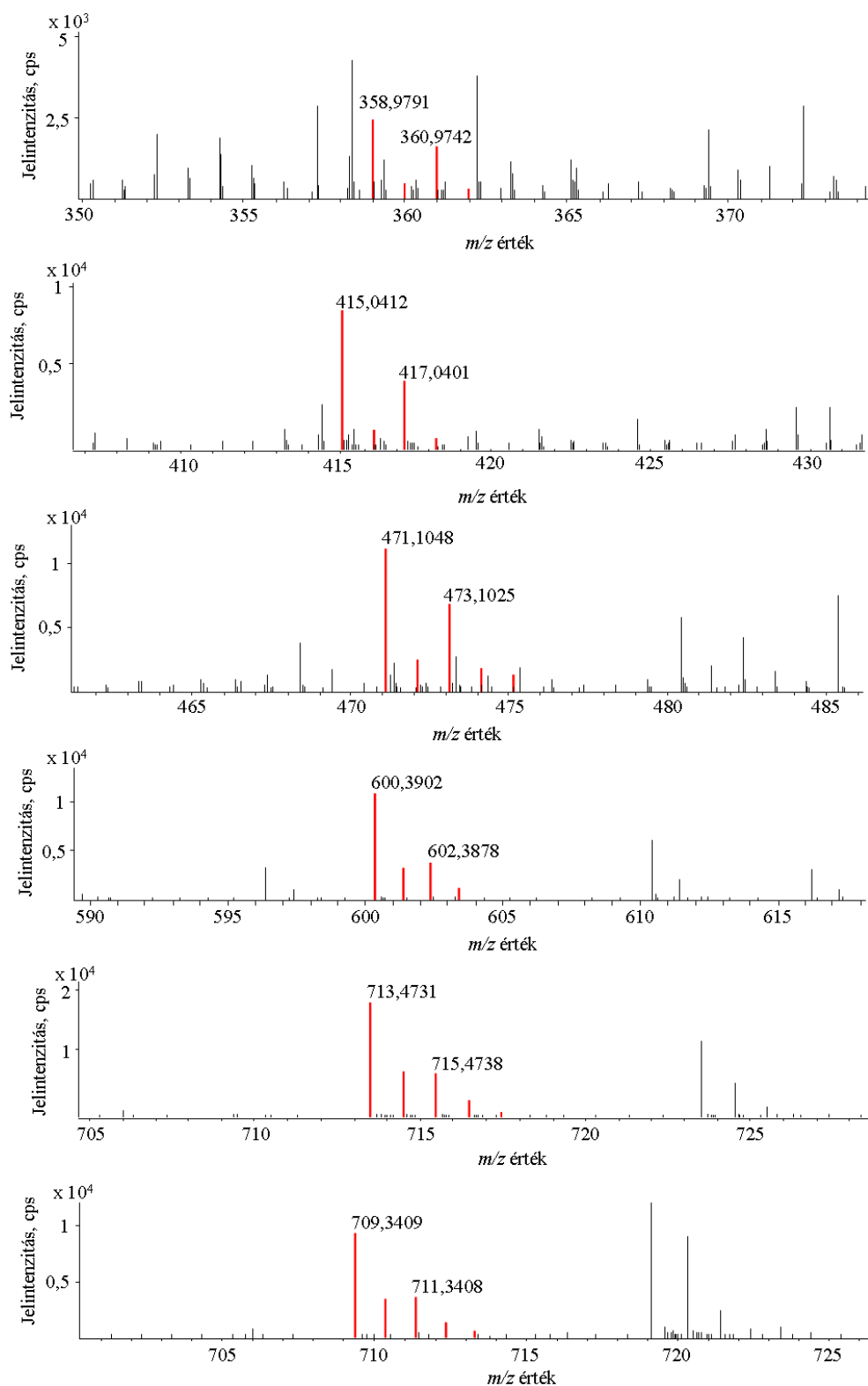
- Marshall, D.D., Lei, S., Worley, B., Huang, Y., Garcia-Garcia, A., Franco, R., Dodds, E.D., Powers, R., 2014. Combining DI-ESI-MS and NMR datasets for metabolic profiling. *Metabolomics*. In press. doi: 10.1007/s11306-014-0704-4
- Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N., 1996. Progress in table olive debittering: Degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 593–597.
- Martí, A.F. i, Hanada, T., Alonso, J.M., Yamane, H., Tao, R., Company, R.S. i, 2009. A modifier locus affecting the expression of the S-RNase gene could be the cause of breakdown of self-incompatibility in almond. *Sex. Plant Reprod.* 22, 179–186. doi:10.1007/s00497-009-0102-7
- McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F., Clarke, A.E., 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342, 955–957. doi:10.1038/342955a0
- McConnell, M.A., Tannock, G.W., 1993. A note on lactobacilli and β -glucuronidase activity in the intestinal contents of mice. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 649–651.
- Milatović, D., Nikolić, D., 2007. Analysis of self-(in) compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82, 170–174.
- Miller, J.H., Singh, A.J., Northcote, P.T., 2010. Microtubule-stabilizing drugs from marine sponges: Focus on peloruside A and zampanolide. *Mar. Drugs* 8, 1059–1079. doi:10.3390/md8041059
- Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S., 2004. A membrane-anchored protein kinase involved in brassica self-incompatibility signaling. *Science* 303, 1516–1519. doi:10.1126/science.1093586
- Nettancourt, D.D., 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-662-04502-2
- Okuda, H., Ogura, K., Kato, A., Takubo, H., Watabe, T., 1998. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 791–799.
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J., 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2302–2310. doi:10.1128/AEM.66.6.2302-2310.2000
- Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Yu, M.-J., Knepper, M.A., 2007. Tandem mass spectrometry in physiology. *Physiology* 22, 390–400. doi:10.1152/physiol.00025.2007
- Polgár, L., García-Reyes, J.F., Fodor, P., Gyepes, A., Dernovics, M., Abrankó, L., Gilbert-López, B., Molina-Díaz, A., 2012. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. *J. Chromatogr. A* 1249, 83–91. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.097
- Poulter, N.S., Vatovec, S., Franklin-Tong, V.E., 2008. Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in *Papaver pollen*. *Plant Physiol.* 146, 1358–1367. doi:10.1104/pp.107.107052
- Prasad Maharjan, R., Ferenci, T., 2003. Global metabolite analysis: The influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 313, 145–154. doi:10.1016/S0003-2697(02)00536-5
- Psychogios, N., Hau, D.D., Peng, J., Guo, A.C., Mandal, R., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Krishnamurthy, R., Eisner, R., Gautam, B., Young, N., Xia, J., Knox, C., Dong, E., Huang, P., Hollander, Z., Pedersen, T.L., Smith, S.R., Bamforth, F., Greiner, R., McManus, B., Newman, J.W., Goodfriend, T., Wishart, D.S., 2011. The human serum metabolome. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0016957
- Qiao, H., Wang, F., Zhao, L., Zhou, J., Lai, Z., Zhang, Y., Robbins, T.P., Xue, Y., 2004. The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-Based self-incompatibility. *Plant Cell Online* 16, 2307–2322. doi:10.1105/tpc.104.024919
- Qi, Y., Jiang, C., Cheng, J., Krausz, K.W., Li, T., Ferrell, J.M., Gonzalez, F.J., Chiang, J.Y.L., 2014. Bile acid signaling in lipid metabolism: Metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. In press. doi: 10.1016/j.bbali.2014.04.008
- Quackenbush, J., 2001. Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.* 2, 418–427. doi:10.1038/35076576
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority, *Annual Review of Microbiology*.

- Rácz, A.B., 2014. „*Lactobacillus casei* 01 törzs glikozilációs képességének vizsgálata haloxyfop, metconazole és tebuconazole peszticidek esetén, továbbá a keletkezett klórtartalmú metabolitjaik meghatározása HPLC-ESI-QTOF kapcsolt rendszerrel”. Szakdolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- Ren, M.-T., Chen, J., Song, Y., Sheng, L.-S., Li, P., Qi, L.-W., 2008. Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 1351–1360. doi:10.1016/j.jpba.2008.09.037
- Roessner-Tunali, U., Liu, J., Leisse, A., Balbo, I., Perez-Melis, A., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2004. Kinetics of labelling of organic and amino acids in potato tubers by gas chromatography-mass spectrometry following incubation in ¹³C labelled isotopes. *Plant J.* 39, 668–679. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02157.x
- Rondon, M.R., Goodman, R.M., Handelsman, J., 1999. The Earth’s bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* 17, 403–409. doi:10.1016/S0167-7799(99)01352-9
- Rozgonyi, 2006. Klinikai, járóbeteg-szakorvosi és háziorvosi mikrobiológiai gyorsdiagnostica - Bacterialis fertőzések diagnosticája I. kötet. HOM-IR Kft., Budapest.
- Ruijter, G.J.G., Visser, J., 1996. Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Methods* 25, 295–302. doi:10.1016/0167-7012(95)00104-2
- Russell, P.E., 2005. A century of fungicide evolution. *J. Agric. Sci.* 143, 11–25. doi:10.1017/S0021859605004971
- Russell, W.M., Klaenhammer, T.R., 2001. Identification and cloning of *gusA*, encoding a new β -glucuronidase from *Lactobacillus gasserii* ADH. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1253–1261. doi:10.1128/AEM.67.3.1253-1261.2001
- Scherling, C., Roscher, C., Giavalisco, P., Schulze, E.D., Weckwerth, W., 2010. Metabolomics unravel contrasting effects of biodiversity on the performance of individual plant species. *PloS One* 5 (9), 2010, Cikk sorszáma: e12569
- Schmitzer, V., Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Krska, B., Stampar, F., 2011. Comparative study of primary and secondary metabolites in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 91, 860–866. doi:10.1002/jsfa.4257
- Sharma, D., Singh Saharan, B., 2014. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int. J. Microbiol.* 2014. doi:10.1155/2014/698713
- Sharma, S., Chandra, P., Mishra, C., Kakkar, P., 2008. Microbiological quality and organochlorine pesticide residue in commercially available ready-to-eat raisins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 387–392. doi:10.1007/s00128-008-9506-6
- Sheridan, H., Krenn, L., Jiang, R., Sutherland, I., Ignatova, S., Marmann, A., Liang, X., Sendker, J., 2012. The potential of metabolic fingerprinting as a tool for the modernisation of TCM preparations. *J. Ethnopharmacol.* 140, 482–491. doi:10.1016/j.jep.2012.01.050
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G., Huang, S., Kao, T., 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429, 302–305. doi:10.1038/nature02523
- Sikorska, H., Smoragiewicz, W., 2013. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 475–481. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.003
- Sjostrom, M., Wold, S., Wieslander, A., Rilfors, L., 1987. Signal peptide amino acid sequences in *Escherichia coli* contain information related to final protein localization. A multivariate data analysis. *EMBO J.* 6, 823–831.
- Smedsgaard, J., 1997. Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures. *J. Chromatogr. A* 760, 264–270. doi:10.1016/S0021-9673(96)00803-5
- Smilde, A.K., Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Lamers, R.-J.A.N., van der Greef, J., Timmerman, M.E., 2005. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* 21, 3043–3048. doi:10.1093/bioinformatics/bti476
- Sonneveld, T., Tobutt, K.R., Vaughan, S.P., Robbins, T.P., 2005. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell Online* 17, 37–51. doi:10.1105/tpc.104.026963
- Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B., Basit, A.W., 2008. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int. J. Pharm.* 363, 1–25. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.009

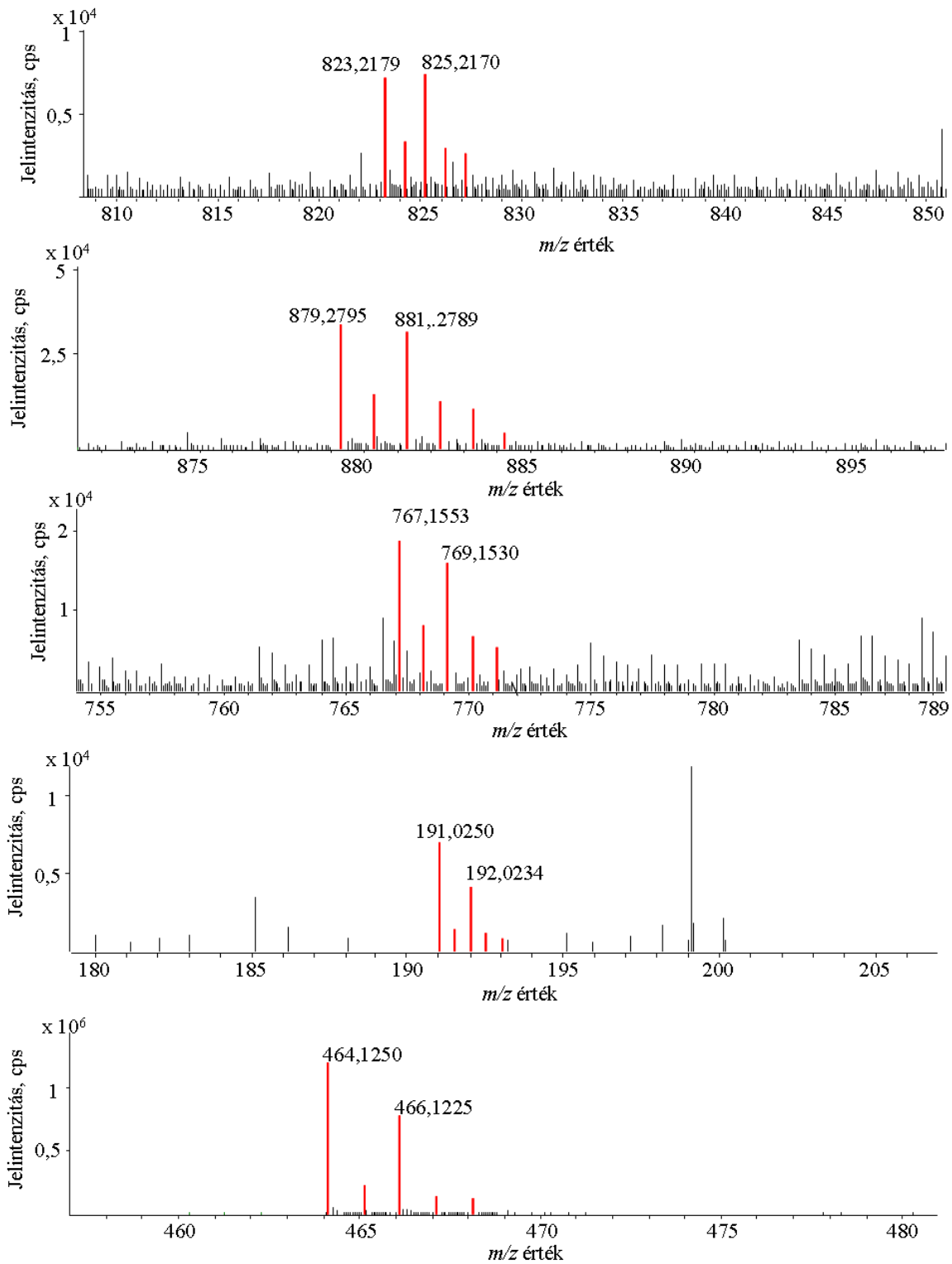
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211–221. doi:10.1007/s11306-007-0082-2
- Taylor, L.P., Hepler, P.K., 1997. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 461–491. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.461
- The Prokaryotes. (2005): Release 3.20 (12/31/2005). <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Thomas, S.G., Huang, S., Li, S., Staiger, C.J., Franklin-Tong, V.E., 2006. Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *J. Cell Biol.* 174, 221–229. doi:10.1083/jcb.200604011
- Thurman, E.M., Ferrer, I., 2010. The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formulas by accurate mass. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2807–2816. doi:10.1007/s00216-010-3562-6
- Thurman, E.M., Ferrer, I., Barceló, D., 2001. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. *Anal. Chem.* 73, 5441–5449. doi:10.1021/ac010506f
- t' Kindt, R., De Veylder, L., Storme, M., Deforce, D., Van Bocxlaer, J., 2008. LC-MS metabolic profiling of *Arabidopsis thaliana* plant leaves and cell cultures: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 871, 37–43. doi:10.1016/j.jchromb.2008.06.039
- t' Kindt, R., Morreel, K., Deforce, D., Boerjan, W., Van Bocxlaer, J., 2009. Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 3572–3580. doi:10.1016/j.jchromb.2009.08.041
- Treinen-Moslen, M., Kanz, M.F., 2006. Intestinal tract injury by drugs: Importance of metabolite delivery by yellow bile road. *Pharmacol. Ther.* 112, 649–667. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.05.007
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Tao, R., Hirano, H., 2003. Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism. *Plant Cell Online* 15, 771–781. doi:10.1105/tpc.009290
- Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N.R., Iezzoni, A.F., Tao, R., 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39, 573–586. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02154.x
- Vaidyanathan, S., Kell, D.B., Goodacre, R., 2002. Flow-injection electrospray ionization mass spectrometry of crude cell extracts for high-throughput bacterial identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 118–128. doi:10.1016/S1044-0305(01)00339-7
- Van Der Greef, J., Smilde, A.K., 2005. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: Past, present, and future. *J. Chemom.* 19, 376–386. doi:10.1002/cem.941
- Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M., Zhao, L., 2011. Impact of microbial transformation of food on health-from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 211–219. doi:10.1016/j.copbio.2010.12.004
- Vigneau-Callahan, K.E., Shestopalov, A.I., Milbury, P.E., Matson, W.R., Kristal, B.S., 2001. Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: Analytical and biological variability issues in rats. *J. Nutr.* 131, 924S–932S.
- Walker, W.A., Goulet, O., Morelli, L., Antoine, J.-M., 2006. Progress in the science of probiotics: From cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *Eur. J. Nutr.* 45, 1–18. doi:10.1007/s00394-006-1101-1
- Wang, C.-L., Xu, G.-H., Jiang, X.-T., Chen, G., Wu, J., Wu, H.-Q., Zhang, S.-L., 2009. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* in vitro. *Plant J.* 57, 220–229. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03681.x
- Wang, L., Chen, Y., Song, Y., Chen, Y., Liu, X., 2008. GC-MS of volatile components of *Schisandra chinensis* obtained by supercritical fluid and conventional extraction. *J. Sep. Sci.* 31, 3238–3245. doi:10.1002/jssc.200800341
- Weckwerth, W., Wenzel, K., Fiehn, O., 2004. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4, 78–83. doi:10.1002/pmic.200200500

- Werner, E., Heilier, J.-F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., Tabet, J.-C., 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 871, 143–163. doi:10.1016/j.jchromb.2008.07.004
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
- Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., Siuzdak, G., 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3698–3703. doi:10.1073/pnas.0812874106
- Wilmes, A., O’Sullivan, D., Chan, A., Chandrasekaran, C., Paterson, I., Northcote, P.T., Flamme, A.C.L., Miller, J.H., 2011. Synergistic interactions between peloruside A and other microtubule-stabilizing and destabilizing agents in cultured human ovarian carcinoma cells and murine T cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 117–126. doi:10.1007/s00280-010-1461-3
- Wu, J., Gu, C., Du, Y.-H., Wu, H.-Q., Liu, W.-S., Liu, N., Lu, J., Zhang, S.-L., 2011. Self-compatibility of “Katy” apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with pollen-part mutations. *Sex. Plant Reprod.* 24, 23–35. doi:10.1007/s00497-010-0148-6
- Wu, Z., Li, M., Zhao, C., Zhou, J., Chang, Y., Li, X., Gao, P., Lu, X., Li, Y., Xu, G., 2010. Urinary metabolomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* 6, 2157–2163. doi:10.1039/c005291d
- Xiao, J.F., Zhou, B., Ransom, H.W., 2012. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 32, 1–14. doi:10.1016/j.trac.2011.08.009
- Xu, Y.-J., Wang, C., Ho, W.E., Ong, C.N., 2014. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC Trends Anal. Chem.* 56, 37–48. doi:10.1016/j.trac.2013.12.009
- Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459.
- Zhang, N., Venkateshwaran, M., Boersma, M., Harms, A., Howes-Podoll, M., Den Os, D., Ané, J.-M., Sussman, M.R., 2012. Metabolomic profiling reveals suppression of oxylipin biosynthesis during the early stages of legume-rhizobia symbiosis. *FEBS Lett.* 586, 3150–3158. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.046
- Zheng, X., Xie, G., Zhao, A., Zhao, L., Yao, C., Chiu, N.H.L., Zhou, Z., Bao, Y., Jia, W., Nicholson, J.K., Jia, W., 2011. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *J. Proteome Res.* 10, 5512–5522. doi:10.1021/pr2007945
- Zulyniak, M.A., Mutch, D.M., 2011. Harnessing metabolomics for nutrition research. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 1005–1015. doi:10.2174/138920111795909113

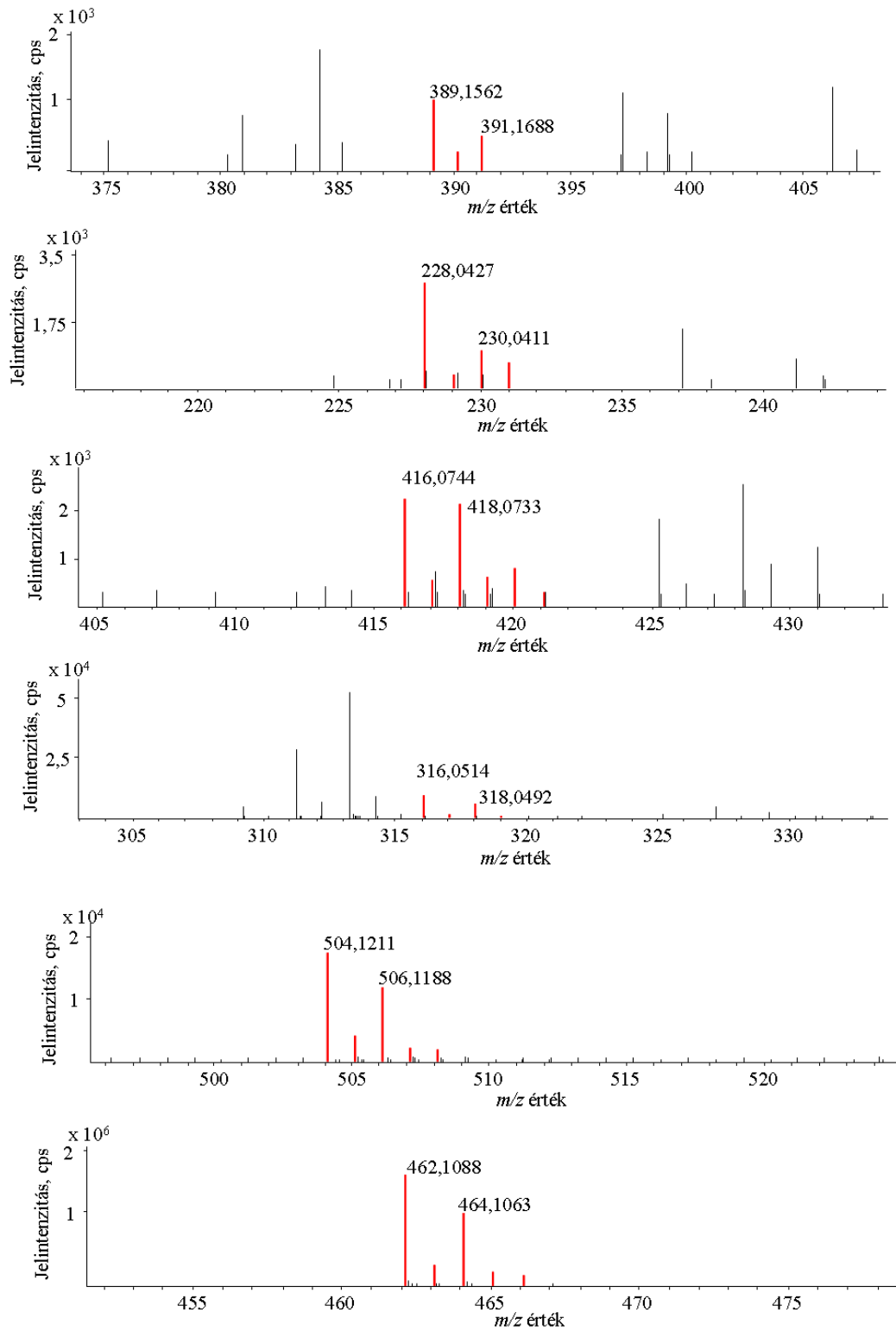
10. MELLÉKLETEK



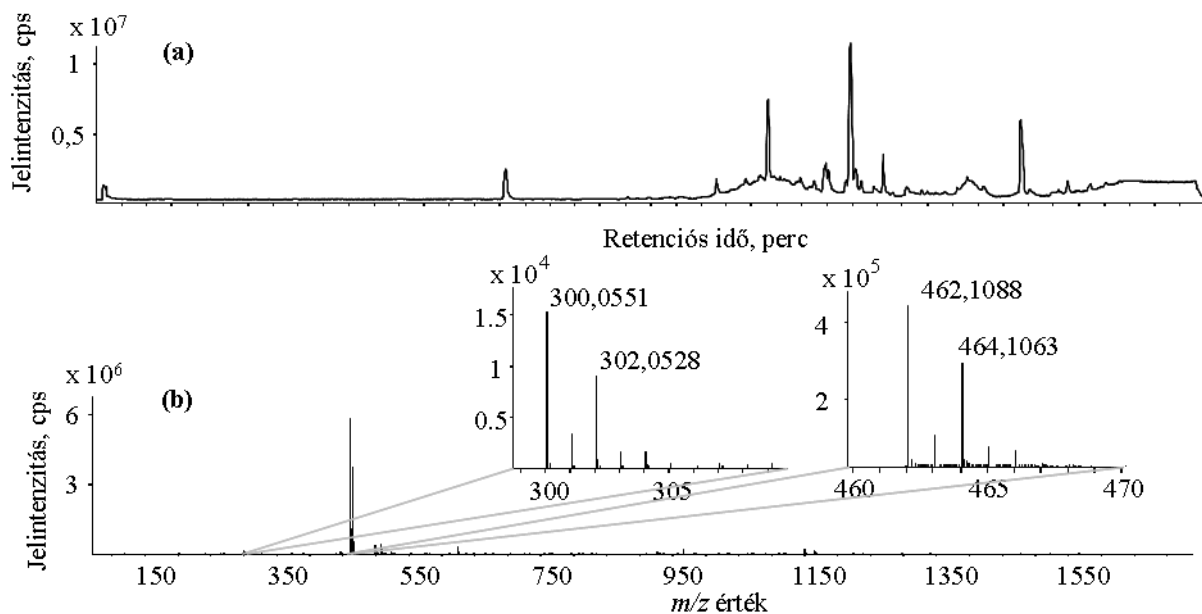
M1. ábra: Az SPE dúsítás nélküli mintákban MFE által kijelölt klór-tartalmú „feature”-k tömegspektrumai. A piros vonalak szemléltetik a felismert izotopológokat.



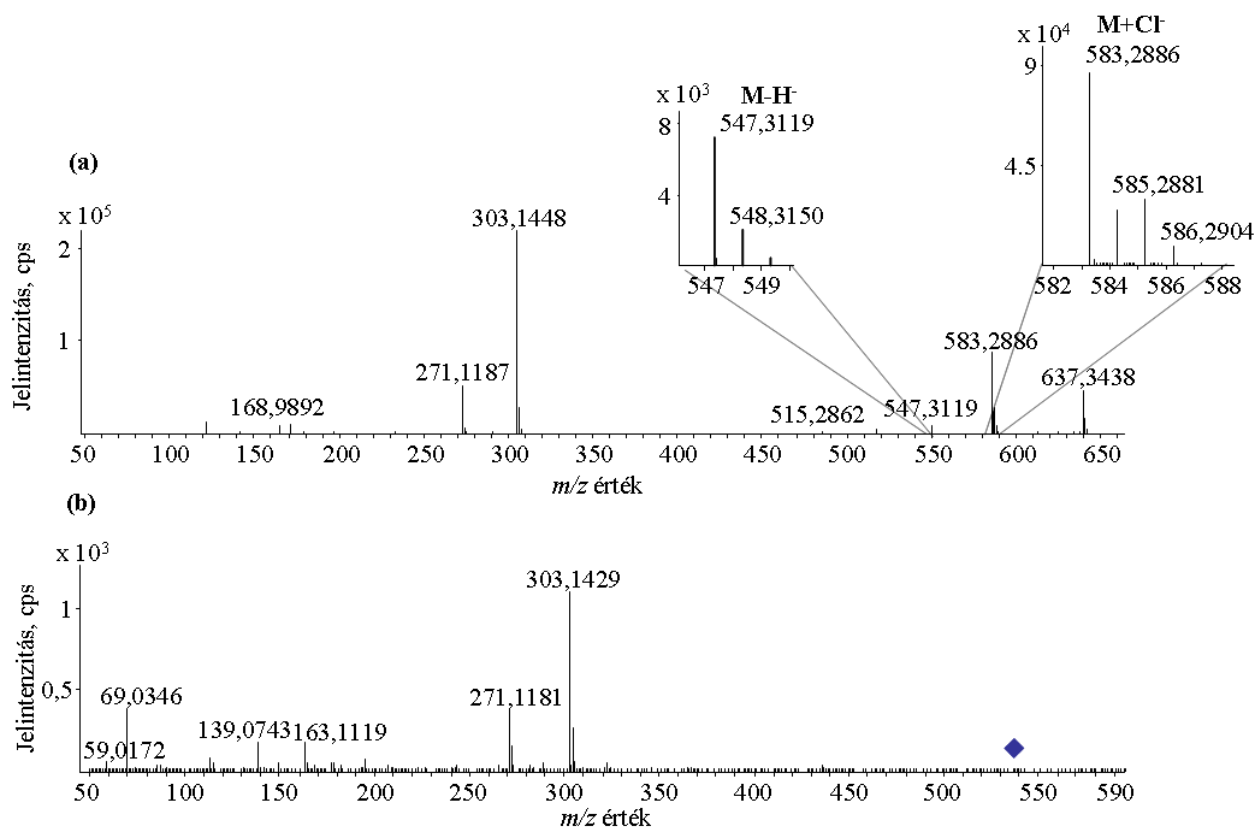
M2. ábra: Az SPE-vel dúsított mintákban talált komponensek tömegspektrumai. A piros vonalak szemléltetik a komponenshez tartozó izotopológokat.



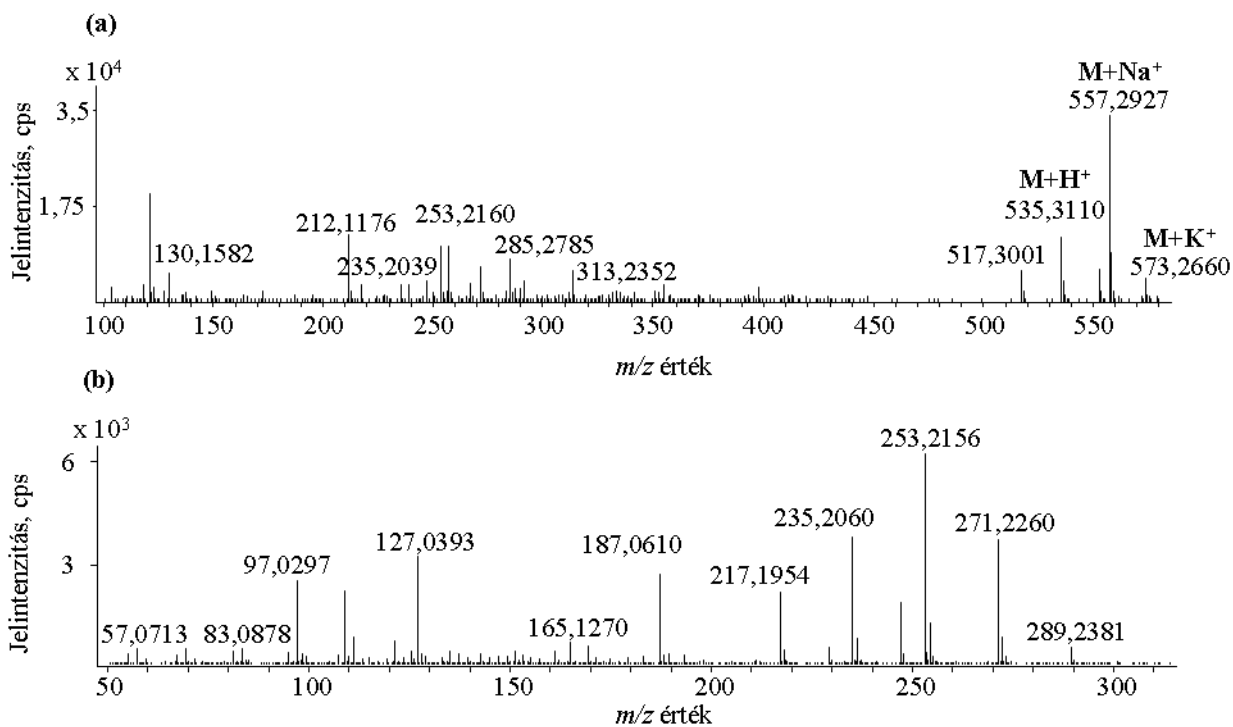
M2. ábra (folytatás): Az SPE-vel dúsított mintákban talált komponensek tömegspektrumai. A piros vonalak szemléltetik a komponenshez tartozó izotopológokat.



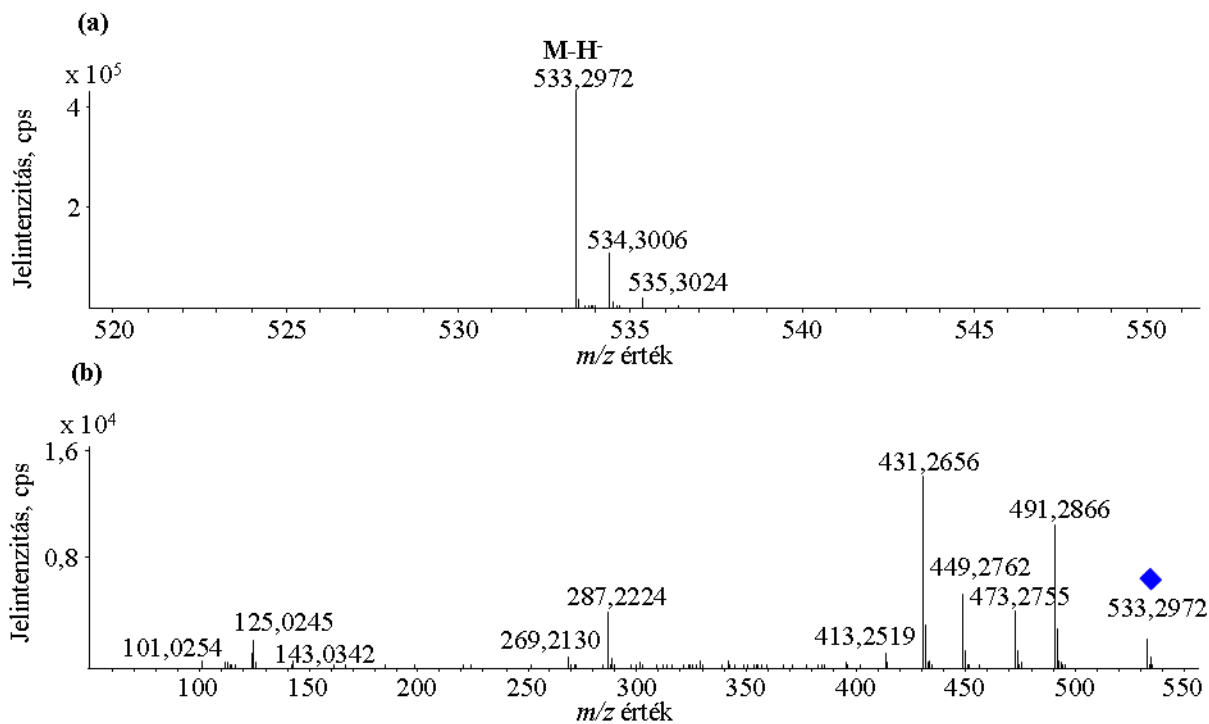
M3. ábra: (a) Az SPE-vel dúsított minta negatív TIC kromatogramja (b) A $t_R=26,8$ percnél rögzített negatív módú MS spektrumban látható a fenhexamid és a fenhexamid-*O*-glükozid izotopológ eloszlása.



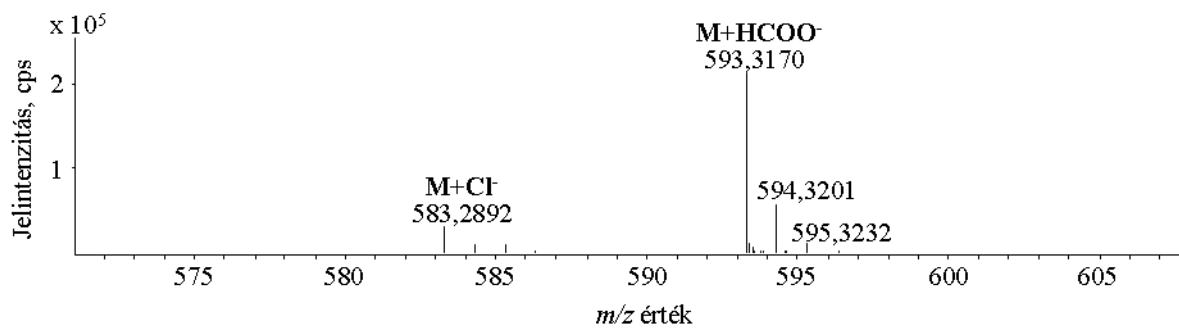
M4. ábra: A Peloruside A standard 7,7 perces retenciós időnél rögzített negatív MS spektruma (a) és az m/z 547,3119 prekursor ion MS² spektruma (b).



M5. ábra: Az 1. komponens 8,9 perces retenciós időnél található pozitív MS spektruma (a) és az m/z 535,3110 prekursor ion MS² spektruma (b).



M6. ábra: Az 1. komponens 8,9 perces retenciós időnél rögzített negatív MS spektruma (a) és az m/z 533,2972 prekursor ion MS² spektruma (b).



M7. ábra: A 4. komponens 10,1 perces retenciós időnél rögzített negatív MS spektruma. Az MS^2 spektruma nem volt informatív a benne található fragmensek alacsony intenzitása miatt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként, szeretném megköszönni családomnak, hogy a PhD hallgatóként eltöltött időszak alatt végig támogattak és hogy már két év után meg is tanulták a helyes rövidítést.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hegedűs Attilának és Dr. Dernovics Mihálynak, akik doktori munkám teljes ideje alatt segítették munkámat, anyagi forrásokról gondoskodtak és szakmailag támogattak.

Köszönetet mondok Stefanovitsné Dr. Bányai Évának, Dr. Fodor Péternek és Dr. Pedryc Andrzejnek, hogy az Alkalmazott Kémia Tanszéken, illetve a Genetika és Növénynevelés Tanszéken biztosították azt az anyagi és szakismereti hátteret, melyre munkámat építhettem.

Köszönöm a két tanszék összes dolgozójának, illetve doktorandusz társaimnak, hogy az egyetemen töltött idő alatt az oldott légkör megteremtésével segítették munkámat, illetve hogy sosem sajnálták a forralt bort a karácsonyi összejöveleteken és egyéb kedélyjavítókat a nagymarosi találkozókra, Pumpaya és egyéb konferenciákon.

Köszönettel tartozom a bécsi Universitát für Bodenkultur, Wien (BOKU) Analitikai Kémia Tanszékén dolgozóknak, köztük Dr. Stephan Hannak, hogy lehetőségem volt köztük három kedélyes hónapot eltölteni és megismerkedni az ott folyó munkával.

Köszönöm a Sör- és Szeszipari Tanszék, illetve az Érzékszervi laboratórium együttműködését.

Köszönöm a Waters Kft.-nek, hogy rendelkezésemre bocsájtotta a kísérletekhez szükséges SPE tölteteket.

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom továbbá a következő pályázatoknak:

- TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001, “Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program”
- TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KMR-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2.B-10/1-2010-0023
- Erasmus Ösztöndíj