

Doktori értekezés tézisei Ph.D. fokozat elnyerésére



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

**Lénárt József**

doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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

## BEVEZETÉS

A metabolomika a kis, jellemzően 1,5 - 2 kDa alatti molekulatömegű elsődleges- illetve másodlagos anyagcseretermékek vizsgálatával foglalkozó tudományág, amely napjainkban egyre népszerűbb és ennek köszönhetően gyorsan fejlődik. A transzkriptomika és proteomika eredményeit kiegészítve a metabolomika a végleges fenotípushoz nagymértékben hozzájáruló anyagcseretermékek vizsgálata által nagyban elősegítheti anyagcsere útvonalak felfedezését, biomarkerek keresését, illetve biokémiai folyamatok megismerését. A metabolomikai vizsgálatok alkalmazhatóságának köre emiatt meglehetősen széles, disszertációmban két külön feladat megvalósítására alkalmaztam.

Munkám során részben xenobiotikumok (görög eredetű kifejezés, jelentése idegen) vizsgálatával foglalkoztam, amelyek környezetidegen, nem természetes, ember által szintetizált vegyi anyagok. 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 szervezetet többféle módon is érhetik káros hatások. Ennek legnyilvánvalóbb módja az elfogyasztott xenobiotikumokkal való közvetlen érintkezés. Ezen felül azonban a szervezetet érő káros hatások között jelentős az olyan reaktív metabolitok formálódása, amelyek xenobiotikumok és a gasztro-intesztinális rendszer mikrobiomjának (köztük *Lactobacillus* fajok) kölcsönhatásaként jelennek meg számottevő mennyiségben. A mikrobiom és peszticidek kölcsönhatása során keletkező xenobiotikumok, vizsgálata emiatt releváns témát képvisel.

Munkám második részében 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.

# 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*. Céлом volt egy olyan módszer kidolgozása, amely segítségével a klór-tartalmú metabolitok szoftveresen felismerhetők. További céлом volt a baktérium és fenhexamid kölcsönhatásából keletkező klór-tartalmú xenobiotikumok felismerése és azonosítása.

## Második célkitűzés:

A *Rosaceae* családba tartozó egyik gyümölcsfaj, a kajszai önmeddőségét vizsgáltam metabolomikai ujjenyomatkészítés segítségével. Az önmeddőségi reakciók lefolyása nem teljesen tisztázott, ennek értelmében kitűzött céljaim a következők voltak:

- LC-MS alapú metabolomikai ujjenyomatkészítéssel követtem nyomon az önmeddő és öntermékeny kajszivirágok bibéjében az önmegporzást követően lejátszódó folyamatokat. E típusú metabolomikai ujjenyomatkészítéssel céлом 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 céлом.

# ANYAG ÉS MÓDSZER

A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz Agilent 1100 típusú bináris HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) készüléket alkalmaztam. Állófázisként fordított fázisú Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5  $\mu$ m, 2,1 mm x 50 mm; Agilent) oszlopot használtam. A kísérleteim során alkalmazott tömegspektrométer egy Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) típusú készülék volt. A folyadékkromatográfiás rendszer és a tömegspektrométer összekapcsolása elektroporlasztásos ionforrás (ESI), úgynevezett Dual-spray ionforrással történt. A készülék tömegpontossága 3 ppm alatti, tömegfelbontása pedig >10.000 (FWHM) volt  $m/z$  400 értéknél, amit egy több peszticidből álló standard oldat vizsgálata során ellenőriztem. Mind az *L. casei* által előállított fenhexamid eredetű xenobiotikumok keresése, mind a kajszai gyümölcsfák metabolomikai vizsgálata során ugyanazt a készülékpárosítást alkalmaztam. A fordított fázisú elválasztás során

gradiens elúciót alkalmaztam a már említett RP C18-as állófázis segítségével. A tömegspektrométer beállításai és az alkalmazott adatrögzítési módok is megegyeztek: mindkét esetben először MS<sup>1</sup> módú detektálást alkalmaztam, majd miután szoftveres eljárással kiszűrtem a differenciáló komponenseket, Auto MS/MS módban történt azok fragmentációja. A tömegspektrumot MS<sup>1</sup> módban  $m/z$  100-1700 tartományban, MS<sup>2</sup> módban pedig  $m/z$  50-1700 tartományban rögzítettem.

Az előkészített minták fenti kapcsolt rendszerrel történő analízise után a kapott mérési fájlokban nem célzott kereső, úgynevezett Molecular Feature Extraction (MFE) algoritmust használtam a metabolitok megtalálására. Az algoritmus használatára a biológiai mátrixokra jellemző nagyszámú komponens jelenléte miatt volt szükség. A szoftvergyártó ajánlásai szerint az úgynevezett „rekurzív” munkamenetet használtam, amely az algoritmus hatékonyabb működését szolgálja.

A *Lactobacillus casei* által termelt klór-tartalmú xenobiotikumok vizsgálata során alkalmazott *L. casei* Shirota törzstenyészetek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származnak (NCAIM, Budapest). A baktérium és fenhexamid kölcsönhatását *in-vitro* vizsgáltam MRS tápközegben 5, 40 és 100 µg/ml fenhexamid koncentráció mellett. A tápközégeket 72 óráig 37 °C-on tartottuk, a mintákon kívül pedig sejtmertes kontroll minták is készültek, amelyek 100 µg/ml fenhexamidot tartalmaztak. A minták begyűjtése a fermentáció elindítása után 24, 48 és 72 órával történt, mely mintákból centrifugálás útján jutottam hozzá a felülúszókhoz, amelyeket 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. Egy későbbi lépésben a mintákat C18-as típusú szilárd fázisú extrakciós (SPE) töltetek segítségével dúsítottam, hogy az alacsony koncentrációban jelen lévő xenobiotikumokat is detektálni tudjam. Az MFE komponenskeresés során talált komponensek közül a klór-tartalmúakra 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.

A kajszi önmeddőségének metabolomikai ujjlenyomatkészítése során a kísérletek lefolytatásához két kajszifajtát választottam: az önmeddő ‘Ceglédi óriást’ (S<sub>8</sub>S<sub>9</sub>) és az öntermékenyülő ‘Pannóniát’ (S<sub>C</sub>S<sub>C</sub>). A kajszifákról először ágakat gyűjtöttem, amelyeken 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 pollenekkel irányítottan poroztam be. 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 leszedését követően a bibéket azonnal folyékony N<sub>2</sub>-be, majd -80 °C-os fagyasztóba helyeztem a kísérletek elvégzéséig. Ezután dörzsmozsárban porrá aprítottam őket 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 párhuzamost 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 rázógépből való ráztatás segítségével hajtottam végre. Az extrakciót követően az oldhatatlan növényi szöveteket centrifugálással választottam el az extraktumtól. A dekantált felülúszókat ioncserélt vízzel 10-szeresére hígítottam, majd 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendő szűrővel való szűrés után injektáltam az LC-MS rendszerbe. Az MFE algoritmus segítségével talált komponensek közül statisztikai módszerekkel szűrtem ki a megkülönböztetőket. 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 főkomponens analízis (PCA) lefuttatása a csoportok egymástól való megkülönböztetésének vizualizálására és a szignifikáns metabolitok meghatározására.

## EREDMÉNYEK

### Fenhexamid eredetű xenobiotikumok keresése *Lactobacillus casei* tenyészetekben

A sejttenyészetek közül egyik fenhexamid koncentráció esetében sem tapasztaltam sejtpusztulást. A fenhexamid 100 µg/ml-től nagyobb koncentrációjának alkalmazását azonban már nem tartottam indokoltnak, hiszen ez az érték így is 2,5-szer nagyobb, mint bármelyik zöldségre vagy gyümölcsre érvényes legnagyobb MRL érték, ezért a 100 µg/ml-es fenhexamid koncentrációjú tenyészetekkel végeztem a vizsgálatokat. A TIC kromatogramokon jelentkező zsúfoltság miatt módosítottam a kezdeti gradiens elúció programját. Bár nem sikerült minden kiválasztott komponenst egymástól alapvonalban 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 kromatográfias felbontás ( $R_s$ ) értékek pozitív irányú változása.

Következő lépésben annak érdekében, hogy bizonyos szintű visszajelzést kapjak a nem célzott kereső algoritmus megbízhatóságáról, szükségesnek tartottam, hogy kipróbáljam használatát 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 peszticidet megtaláljam, illetve, hogy minél kevesebb legyen a téves találatok száma. Erre a célra egy 17 klór-tartalmú peszticidből álló standard keverék törzsoldatot készítettem, amelyet 10 ng/ml-es koncentrációra hígítottam. Az algoritmus klór-tartalmú komponensek biológiai mátrixban való felismerésének bizonyítására a korábban alkalmazott peszticideket MRS tápközegbe is addicionáltam, amelyben az alkalmazott beállítások mellett (az alapbeállításokkal szemben) ugyancsak képes volt felismerni a szoftver az összes peszticidet (17/17) legalább 4 izotopológgal komponensenként. A tapasztalatok alapján az optimált beállításokat használtam a komponenskeresés során. Az algoritmus beállításainak optimalása ellenére természetesen továbbra is hibázhat a szoftver, ami miatt a manuális felülvizsgálat és korrekció nem küszöbölhető ki, viszont jelentősen javul a molekulák felismerésének minősége.

Mivel fenhexamid eredetű bomlás- illetve detoxikációs termékeket kerestem, felhasználtam a korábban már meghatározott komponensekről rendelkezésre álló információit, miszerint a fenhexamidban jelenlévő klór-tartalmú hidroxifenil csoport nem bomlik fel és a 2-es vagy 3-as pozícióban lévő klór atomok közül az egyik mindenképp a detoxikációs terméken marad. 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. A szoftveres felismertést 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. 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.

A kontroll és kezelt tenyészeteket először dúsítás nélkül vizsgáltam, amely során a fenhexamidon és gyártásból eredő melléktermékein kívül nem talált klór-tartalmú komponenseket a szoftver, tehát a keresett metabolitok valószínűleg alacsonyabb koncentrációtartományban vannak jelen a sejtenyészetben. 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 SPE tölteten, ezért annak segítségével dúsítottam a mintákat. A dúsítás után talált legintenzívebb klór-tartalmú metabolit (463,1176 Da) pozitív és negatív ion módban is jelentkezett. Ezen kívül még egy nagyobb intenzitású komponenszt találtam negatív ion módban (505,1279 Da). A legintenzívebb komponens pontos tömege, illetve összegképlete megegyezett a fenhexamid glükóz származékáéval, a fenhexamid-O-glükozidéval, amely egyike az eddig azonosított növényi detoxikációs termékeknek. Szerencsés módon rendelkezésemre állt egy egyedi szintézis során nyert fenhexamid-O-glükozid standard vegyület, amelynek ugyanabba az LC-MS rendszerbe történő injektálása során megbizonyosodtam a komponens és a standard retenciós idejének, MS<sup>1</sup> és MS<sup>2</sup> tömegspektrumának egyezősége alapján arról, hogy a keresett komponens a fenhexamid-O-glükozid. Utóbbi komponensről is bebizonyosodott, hogy fenhexamid eredetű, mert tömegspektrumában in-source fragmenseként megjelent a fenhexamid. Mivel azonban sajnos az MS<sup>2</sup> fragmensek intenzitása és a tapasztalt tömegpontosság nem bizonyult elegendőnek az egyértelmű azonosításhoz, és nincs korábban azonosított, az 505,1279 Da tömegének megfelelő fenhexamid származék, ez a komponens nem volt egyértelműen azonosítható jelen körülmények között.

Annak ellenére, hogy a glikozilálás a baktériumok esetén a komponensek oldhatóságának, illetve stabilizálásának egy ismert módja, a fenhexamid-O-glükozidot és ismereteink szerint egyetlen más peszticid-glikozidot sem azonosítottak még korábban baktériumokban. Ezek alapján a fenhexamidtól hidrofílebb fenhexamid-O-glükozid és a detektált, feltételezhetően glükozid 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 valóban megtörténik-e.



## **A kajszi önmeddőségi reakcióinak vizsgálata metabolomikai ujlenyomatkészítéssel**

Az alkalmazott metanolos extrakciónak köszönhetően nagyszámú komponens volt jelen az extraktumokban. A metabolitok keresése ugyancsak nem célzott módon történt, azonban a korábbi esettől eltérően nem volt semmilyen közös tulajdonság, amely alapján leszűkült volna az azonosítandó metabolitok köre. Az algoritmus lefuttatása során törekedtem a minél hatékonyabb működésre, ezért a korábban bemutatott peszticid standard oldattal való optimálás paramétereit jelen esetben is alkalmaztam. Bár kajszi bibékben nem vártam klórtartalmú komponenseket, a beállítások változtatását semmi nem indokolta, 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 kajszi minták 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. A statisztikai különbségtétel pozitív módban 72, míg negatív ion módban 61 megkülönböztető komponens eredményezett. A 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. Végül 15 szignifikáns megkülönböztető komponens találtam. A végső lista alapján végzett PCA és Heatmap ábrázolás alapján a minták mind megporzási idő, mind kompatibilitás szerint egyértelműen megkülönböztethetők egymástól. A fajták és velük együtt az önmeddő/öntermékenyülő reakciók az F2 főkomponens 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.

A legnagyobb intenzitású és legnagyobb mértékben megkülönböztető metabolit monoton intenzitásnövekedést mutatott az idő függvényében az önmeddő ‘Ceglédi óriás’ fajtában, pozitív ionmódban (negatív módban is megkülönböztető). A komponens retenció 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 MS<sup>1</sup> spektrumban jelen lévő molekulaionokat, és amelyik MS<sup>2</sup> spektrumában megtalálhatók voltak

az in-source fragmensek, azt tekintettem protonált formának, jelen esetben ez az  $m/z$  549,3266 ion volt. Az in-source fragmensek jelenléte azért is bizonyult nagyon hasznosnak, mert így a teljes izotopológ mintázatuk megjelent, ami alapján pontosabban meg tudtam határozni összegképletüket ( $MS^2$  spektrumban az izotopológ eloszlás nem pontos). A komponens összegképletét végül a szoftverben található összegképlet generátor segítségével határoztam meg, a lehetséges összegképletek közül a  $C_{27}H_{47}O_{10}$  bizonyult valósnak. Ezek után az összegképlet alapján adatbázisos keresést folytattam, amely adatbázisok közül a legtöbb információval a DNP és a Scifinder szolgált. Megfigyeléseimre alapozva a Peloruside A tűnt 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 keresett komponens a Peloruside A. Nevezetesen az, hogy a megkülönböztető komponensek listájában szereplő egy másik, szignifikánsan megkülönböztető metabolit összegképlete  $C_{26}H_{47}O_{11}$ -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. Ismert, hogy az önmeddő kajszi bibékben a pollentömlők fejlődése a bibeszál alsó negyedében megtorpan, megakadályozva ezzel a pollenszemek petesejthez való eljutását, ezáltal a megtermékenyítést. Ez a jelenség, úgy gondoltam talán összefügghet a Peloruside A és rokon szerkezeteinek mikrotubulus stabilizáló hatásával. A Peloruside A tumorelleses hatását korábban emberi petefészek daganatsejteken és rágsálók T sejtjein végzett kísérletekkel bizonyították. Mindkét forrásból kapott Peloruside A mintát ugyanabba a kromatográfiás rendszerbe injektáltam és retenciós idejét,  $MS^1$  és  $MS^2$  tömegspektrumát összehasonlítottam a keresett komponensével. 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 említett két komponens is a poliketid vázú makrolidek csoportjába tartozik, a Peloruside rokon szerkezeteihez hasonló hatással bírnak. A többi megkülönböztető közül egy komponens azonosítását próbáltam meg standard vegyület beszerzését követően, azonban az sem vezetett sikerre. A többi megkülönböztető komponens nem próbáltam meg  $MS^2$  kísérletekkel azonosítani, leginkább alacsony intenzitásuk és az ezzel együtt járó pontatlan izotopológ eloszlásból fakadó nem megbízható összegképlet meghatározás miatt.

A kajszi bibék önmeddő és öntermékenyülő megporzást követő metabolomikai vizsgálatával 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 feltételezett metabolitokat találnom, amelyek a kompatibilitási reakciók kimenetelét illetően feltételezhetően nagy jelentőséggel bírnak, és megfigyeléseim a rendelkezésre álló genetikai és proteomikai információn túl segíthet a mögötte álló fiziológiai reakciók megértésében.

## 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 addíciónált klór-tartalmú peszticid vizsgálatával bizonyítottam.

2. Az algoritmus megfelelő beállításainak köszönhetően a baktérium felülűszójában sikerült klór-tartalmú komponenseket kimutatnom. A baktérium felülűszójában 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 komponensről 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.

## PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

### **Magyar és angol nyelvű konferencia kiadványok:**

**Lénárt, J.;** Dernovics, M.; Kovács, B.: Lactobacillus ssp. eredetű xenobiotikum-származék azonosítása kémiai szintézissel és HPLC-ESI-QTOF-MS rendszer segítségével, Vegyészkonferencia 2013, Hajdúszoboszló, 2013.06.26-28.

**Lénárt, J.;** Hegedűs, A.; Györfi, J.; Dernovics, M.: Indirect Se-metabolomics: complexity of influenced non-Se pathways, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2013, Krakkó, 2013.02.10-15.

Egressy-Molnár, O.; **Lénárt, J.;** Györfi, J.; Dernovics, M.: Hericium erinaceus: a mushroom with yeast-like Se-metabolism, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2013, Krakkó, 2013.02.10-15.

**Lénárt, J.;** Györfi, J.; Hegedűs, A.; Dernovics, M.: Non-usual way of Selenium-metabolomics: Searching for the influenced pathways, 4th International Symposium on Trace Elements in the Food Chain. Friends Or Foes?, Visegrád, 2012.11.15-17.

**Lénárt, J.,** Dernovics, M.; Hegedűs, A.: Kísérleti rendszer kidolgozása gyümölcsfák önmérségének proteomikai és metabolomikai vizsgálatára. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok: Növényneveléssel kultúrnövényeink sokféleségéért. Budapest, 2011.04.27.

**Lénárt, J.;** Kovács, B.; Dernovics, M.: Élelmiszeripari minták elemanalitikai vizsgálatai LC-MS kapcsolt technikával, Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban workshop, Budapest, 2014.01.16.

Dernovics, M., **Lénárt, J.,** Gere, A., Hegedűs, A.: Kajszfajták önmérségének metabolomikai háttere: elsőfokú megközelítés, Pannon biotechnológiai szemináriumok VIII., Szeged, 2014.10.21

### **Angol nyelvű folyóirat cikk:**

**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), 8969-8975  
(IF: 3.107)

Hegedűs, A.; **Lénárt, J.**; Halász J. (2012) Review of sexual incompatibility in tree fruit species: molecular interactions and evolutionary dynamics. Biol. Plantarum, 56 (2), 201-209  
(IF: 1.692)

### **Magyar nyelvű folyóirat cikk:**

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