

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

PÓS VERONIKA



Témavezető: Dr. Lukács Noémi, DSc

Budapesti Corvinus Egyetem
Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

Budapest
2010.

A doktori iskola
megnevezése:

Interdiszciplináris (Kertészettudományi) Doktori Iskola

tudományága:

Biológiai tudományok

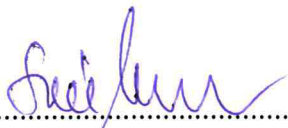
vezetője:

Prof. Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

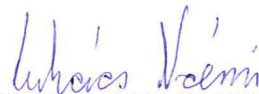
Témavezető:

Prof. Dr. Lukács Noémi
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Növényélettan és Növényi Biokémia 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 védési eljárásra bocsátható.



.....
Dr. Tóth Magdolna
Az iskolavezető jóváhagyása



.....
Dr. Lukács Noémi
A témavezető jóváhagyása

BEVEZETÉS

A mezőgazdasági növények termesztése során a nagy hozamot adó, értékes állományokat számos abiotikus és biotikus stressztényező veszélyezteti. Az ellenálló fajták kiszűrésének és a toleranciára vagy rezisztenciára való nemesítésnek előfeltétele, hogy egy kellően érzékeny módszer álljon rendelkezésünkre a növényi stresszállapot korai felismeréséhez és a védekezési folyamatok nyomon követéséhez.

A proteomika a modern rendszerbiológiai megközelítéseknek az az ága, amely nagy felbontású és pillanatszerű felvételt képes adni egy élőlény azon fehérjéinek összességéről, amelyek egy kiválasztott szervben, szövetben vagy sejtben az adott élettani állapotban kifejeződnek. A módszer a fehérjemintázatban fellépő különbségekre alapozva közvetlenül alkalmas arra, hogy azonosítsa a megváltozott minőségű/mennyiségű fehérjéket és rajtuk keresztül a kódoló géneket, valamint a változás által potenciálisan érintett anyagcsere-folyamatokat. Kellő referencia birtokában a változás jellegéből a változást előidéző faktor mibenlétére, a kiváltott hatás erősségére és időbeli lefolyására is következtethetünk.

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

Doktori munkám során a biotikus és abiotikus stresszválasz kapcsán indukálódó, továbbá a preformált védekezésben potenciálisan közreműködő apoplasztfehérjék proteomikai elemzését végeztük különböző genotípusú, levélrozsda-fertőzött illetve egészséges búza, továbbá kadmium-stresszelt árpa csíranövényeken.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteim célja a növény fehérjemintázatában tükröződő stresszválasz jellemzése volt, a növény egy speciálisnak tekinthető szöveti régiójában, a sejtközötti állományban.

A. Elsőként, a biotikus stresszrezisztencia-kutatásokkal összefüggésben arra kerestük a választ, hogy mutatnak-e közel izogén, rezisztens ill. fogékony búzavonalak az apoplasztfehérjemintázatában kimutatható különbséget a búza (*T. aestivum* L.) termesztett állományait jelentős mértékben veszélyeztető levélrozsda (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) fertőzést követően. Bár a választott, Lr1 és Lr9 rezisztenciagéneket hordozó vonalak szántóföldi al-

kalmazhatóságának különbségei tapasztalati szinten jól ismertek, a rezisztenciagének jelenléte okán módosuló stresszválaszok pontos mikéntje az érintett gének ill. fehérjék szintjén mindeddig nem ismert. A stresszválaszban résztvevő apoplasztfehérjéket differenciál expressziós proteomikai eljárással, tömegspektrometriai alapon és aktivitás vizsgálatokkal azonosítottuk. A feltételezett indukció megerősítésére transzkripciós analíziseket végeztünk.

- B. Abiotikus stresszként a nehézfémzennyezés különböző formái közül világszinten jelentős kadmiumstresszt vizsgáltuk, az árpa mérsékelt ellenálló 'Mandolina' fajtájának csíranövényein. Proteomikai analízisünk arra irányult, hogy tisztázzuk, azonosíthatóak-e a nehézfémstresszre specifikusan szekretálódó fehérjék a sejtközi állományban, vagy a változások inkább a kadmiumstressz kapcsán másodlagosan fellépő, általánosabb jellegű stresszválasz fehérjekomponenseivel társíthatóak.
- C. Végül, proteomikai térképezést kezdtünk meg a genetikai állományát tekintve a búzafajták közt leginkább kutatott cv. 'Chinese Spring' egészséges csíranövényeinek apoplasztján, hogy megismerjük, normál élettani körülmények között milyen feladatkörű fehérjék vannak jelen egy korai fejlődési állapotú vegetatív szerv, a levél intercellulárisaiban. A munka távolabbi célja, hogy a stresszválaszok jövőbeni katalogizálásához megfelelő referenciatérkép létrehozásával szolgálhassunk.

Vizsgálataink mind a biotikus, mind pedig az abiotikus stresszorhoz köthető modellrendszerben leginkább a stresszfehérjék egy meghatározott körére, az ún. PR („pathogenesis-related”, kórfolyamattal összefüggésbe hozható) fehérjék szekretált formáinak expressziójában fellépő változások jellemzésére irányultak.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag és mintaelőkészítés

A búza-levélrozsda (*P. recondita* f.sp. *tritici*) fertőzéssel asszociált növényi fehérje és génexpresszió-változás vizsgálatára gazdanövényként a biotróf patogén legtöbb rasszára fókuszosan reagáló *T. aestivum* cv. 'Thatcher' búzafajtát és annak két, közel izogén, *Lr1* illetve *Lr9* rezisztenciagént hordozó búzavonalát választottuk. Az *Lr1* és *Lr9* vonalak a levélrozsda fertőzésinkben felhasznált 43722-es patotípusával szemben hiperszenzitív jellegű rezisztenciát mutatnak, de szabadföldi körülmények között eltérő fokú csíranövénykori ellenállóképességet biztosíthatnak. A *Tc* és *Lr9* magállományt és a minták fertőzését Dr. Manninger Sándorné

(MTA NKI, Kóréletani Osztály) biztosította számunkra, az Lr1-hez pedig, kiegészítő forrásként J.A. Kolmer (U.S. Department of Agriculture, ARS - Cereal Disease Laboratory) nagylelkű ajándékaiként jutottunk. A mintavételt a 16 h fény / 8 h sötétperiódus szerint, 20 °C-on nevelt és 7 napos korukban fertőzött vagy mock-fertőzött csíranövényeken az inokulációt követő fél napon belül átlagosan 2,5 óránként, majd naponta (1-7. d.p.i.) végeztük.

A kadmium-kezelés kísérleteit az árpa (*H. vulgare* L.) egy kétsoros, tavaszi, széles abiotikus stressztűrőképességgel jellemezhető sörárpa fajtáján, a GK Mandolinán végeztük. A magvak a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft. táplánszentkereszti Növénynevelő Kutató Állomásáról származtak. A vízkultúrában (16 h fény / 8 h sötétperiódus szerint, 21 °C-on) nevelt, 10 napos csíranövényeket 0-10-30-100-300 µM CdCl₂ koncentráció tartományban végeztük a kezelést, a mintavételezést pedig az azt követő 1., 4. és 7. napon, a teljes levélállományra nézve kiviteleztük.

Az apoplast fehérjék referencia-térképezéséhez a nemzetközi búza genomikai vizsgálatokban az egyik legintenzívebben vizsgált fajtát, *T. aestivum* L. cv. 'Chinese Spring'-et választottuk. A szemtermések Dr. Kovács Gézától (MTA MgKI, Gabona Génbank) származtak. Mintáinkat a 14 h fény / 10 h sötétperiódus szerint, 19 °C-on nevelt, egyhetes csíranövények első leveleiből nyertük.

Fehérje-szintű vizsgálatok

Intercelluláris folyadék (ICF) kivonása és előkészítése

Az apoplast folyadék (intercelluláris mosófolyadék, ICF) kinyerése vákuum-infiltrálással kombinált centrifugálással (2000 rpm, 20 min, 4 °C), Rohringer és mtsai (1983) nyomán, módosítva történt. A gélelektroforézisre és az enzimaktivitás mérésekre szánt ICF izolálására 20 ill. 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) és 1 mM PMSF-t tartalmazó infiltráló puffereket alkalmaztunk. A kinyert ICF-et 1/100 térfogat arányban proteáz-inhibitor koktéllal egészítettük ki (Complete Mini, EDTA-free, Roche). Végül a -80 °C-os fagyasztás előtt a gélelektroforézis alapanyagául szolgáló mintákban 8 M-ra állítottuk be az urea koncentrációt.

Az intercelluláris fehérjék koncentrációjának meghatározását Lowry szerint (1951) vagy a 2-D Quant Kittel (*Amersham Biosciences*), míg a 10 kD feletti fehérjefrakció feldúsítását a centrifugális elven működő Icon Concentrator - 9 CO (*Pierce*) molekulaszűrővel végeztük.

Proteomikai analízis

Az apoplasztfehérjék elválasztására egy- és kétdimenziós poliakrilamid-gélelektroforézist választottunk. Az egydimenziós, molekulatömeg szerinti szeparálást (20-30 µg fehérje/minta) redukáló körülmények közt, denaturáló, 12,5 %-os Laemmli-féle diszkontinuus rendszerben végeztük (Laemmli 1970). A 2D-PAGE első fázisában, a töltés szerinti szeparáláshoz az előzetesen koncentrált, 60-120 µg (analitikai) illetve 300 µg összfehérje-tartalmú (félpreparatív analízist célzó) minták fehérjéit szolubilizáltuk (Rabilloud 1998), majd rehidratálással egybekötött, passzív mintafelvitelt követően az izoelektromos fókuszálást 3-10 NL immobilizált pH-gradienst (IPG) tartalmazó géleken kiviteleztek Multiphor™ II (AP) vagy Ettan IPGphor II (AP) készülékekben. A második dimenziót megelőző kétlépcsős ekvibrálás után (redukálás: 1% DTT, alkilálás: 4 % jódacetamid) a proteineket méretük szerint az egydimenziós elválasztáshoz hasonlóan, Protean II xi kamrában (*Bio-Rad*) választottuk el. A fehérjéket kolloidális Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 festéssel (Neuhoff *et al.* 1985), illetve Shevchenko-féle (1996) ezüsfestéssel tettük láthatóvá. A gélképeket EPSON Expression 1680 Pro (EPSON) géldokumentációs rendszerrel rögzítettük és vizuálisan illetve az ImageMaster™ 2D Platinum v4.9 (Amersham Biosciences) kép-analizáló programmal értékeltük ki.

A tömegspektrometriai azonosításra gélből kivágott foltok ill. sávok analízisét az MTA SZBK Dr. Medzihradzky Katalin vezette Proteomikai Kutatócsoportjában Dr. Hunyadi-Gulyás Éva és Dr. Szájli Emília végezte, PSD-spektrummal megerősített MALDI-TOF (Bruker Reflex III) és LC-MS/MS mérésekkel (Agilent 1100LC XCT Plus IonTrap; Thermo LCQ Fleet LC-MS/MS ill. Waters LC-ESI-qTOF). A MascotDistiller szoftverrel feldolgozott tömegspektrometriás adatok lekeresése a MatrixScience és az UCSF ProteinProspector keresőprogramok segítségével zajlott, a szekvencia-összevetések alapját az NCBI nr és a SwissProt adatbázisban, továbbá szükség esetén a az NCBI dbEST és a TIGR *T. aestivum* adatbázisában végzett homológia-lekeresések szolgáltatták.

Enzimaktivitás vizsgálatok

Az enzimaktivitást kolorimetriás eljárásokkal vizsgáltuk. Az endo-1,3-beta-D-glükózidáz aktivitását redukált laminarin (Deanult *et al.* 1978) szubsztrát felhasználásával, egy Dygert és mtsai (1965) és Zheng és Wozniak (1997) nyomán tanszékünkön 10–600 µM glükóz tartományra kidolgozott mikrotiter-rendszerben mértük (Kabai 2008). A kolorimetriás extracelluláris kitináz-assayt Wirth és Wolf (1990) szerint végeztük.

RNS-szintű vizsgálatok

Nukleinsav izolálás és tisztítás

A teljes RNS kivonását TRIzol® (*Invitrogen*) reagenssel végeztük, a DNáz I enzimmel kezelt mintákat háromszoros kloroformos extrahálással tisztítottuk.

RT-PCR

A kísérleteinkben felhasznált, közel 30, különböző specificitású (egyes izoformákra vagy nagyobb kategóriára tervezett) kitináz és glükánáz, valamint ubiquitin búza primereket a Primer3, az IDT és az OligoCalc programok segítségével terveztük meg, az NCBI adatbázisából való előzetes aminosav és nukleotid szekvenciagyűjtés alapján. Az oligo(dT)₁₈-s vagy specifikus primerrel végzett reverz transzkripciót SuperScript™ II ill. III (*Invitrogen*) enzimmel végeztük, a gyártó előírása szerint. A DuplaTaq (*Zenon-Bio*) polimerázzal végzett PCR templátjai a reverz transzkripció során nyert cDNS-ek, vagy a feltárt baktériumklónok ill. azokból izolált plazmidok voltak, melyeket az alábbi protokollal amplifikáltunk: 95 °C, 5 min; T_m-(0,5-2)°C, (30 sec), 72 °C (30 sec)] x 30; 72 °C, 5 min.

PCR-termékek klónozása

A PCR-termékeket 1 % vagy 2,5 % agaróz gélen választottuk el, 1x TBE ill. gélből történő visszaizolálás esetén 1x TAE futtató pufferben (Sambrook *et al.* 1989). A visszaizolált mintákat klónozó vektorba (pTZ57R/T) ligáltuk, az inszertes plazmid-konstrukciót pedig *E. coli* XL1 Blue vagy JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk (Inoue *et al.* 1990), majd klónoztuk (Sambrook *et al.* 1989).

Szekvenciaanalízis

A plazmidba beépült inszert nukleotid sorrendjét az MTA Szegedi Biológiai Központjában határozták meg (ABI 3100 Genetic Analyzer). A szekvenciákat Chromas Lite v2.01 és Vector NTI Advance 10 (*Invitrogen*) szoftverrel analizáltuk.

A cDNS-klónok ill. transzkriptumok és a transzlált vagy tömegspektrometiaileg meghatározott aminosavszekvenciák homológia-vizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét, és a TIGR növényi EST (TA) adatbázisát használtuk fel. A homológok összevetését a Vector NTI Advance 10 szoftverrel és a Jalview 2.4.0.b2 ClustalW programjával végeztük.

A proteinek extracelluláris lokalizációjának igazolásához a SignalP 3.0 szervert alkalmaztuk, a fehérjék lehetséges N- és O-glikozilációs helyek feltárásához pedig a CBS predikciós szervert (NetNGlyc 1.0 és YinOYang 1.2) választottuk.

Törzsfakészítés

A szekvenciák illesztése CLUSTALW2 program segítségével történt, az alapbeállítások alkalmazásával. Az illesztéseket a MEGA4 programcsomag felhasználásával végeztük, ahol a filogenetikai fa a *Neighbour-Joining* módszerrel vagy a maximális parszimónia elvét alkalmazva készült, a nukleotidokat a Kimura-2 paraméter modellel kezeltük, és a *gap*-ek definiálásához a *pairwise-deletion* opciót választottuk. Az egyes ágak jószágának becslésére 1000 ismétlésből álló *bootstrap* analízist végeztünk. Külcsoportot nem jelöltünk ki.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A.) A búza levélrozsda elleni stresszválasz során indukált apoplaszt proteinek

A biotikus stresszválaszt a búza – levélrozsda kölcsönhatásban analizáltuk, a búza (*T. aestivum*) közel izogén, Lr1 és Lr9 rezisztenciagént hordozó vonalain, valamint a fogékony 'Thatcher' alapfajtán. A levélrozsda-fertőzéssel összefüggésben, proteomikai alapon legalább 7 funkcionális proteincsoport, köztük 6 patogenezissel társítható, ún. „PR” család apoplasztba szekretálódó 24 proteinjét mutattuk ki az eltérő ellenállóságot mutató 'Thatcher' alapú búzavonalak (Tc, Lr1, Lr9) apoplasztjában. Ezek közt egyrészt klasszikus, a patogén gombapartner különféle képleteinek sejtfalhasítására alkalmas glükohidroláz-csoportok szerepeltek, így a PR2, azaz a 17. családba sorolt glükohidrolázok A alcsaládjának endo-1,3-glükanázai (öt izoformával) és egy B alcsaládú endo-1,3-1,4-glükanáz, továbbá a PR3-típusú kitinázok I., II. és IV. osztályú izoformái, és a Barwin szuperfamiliaiba sorolt PR4-típusú kitinázok / kitinkötő fehérjék (három képviselővel). Ezek közül, a PR3-típusú kitinázok csoportjában egy II. osztályú kitináz (BAB82471), a PR2 fehérjék közül pedig egy endo-1,3-glükanáz (AAY88778/AAY96422) mindhárom vizsgált genotípusban (Tc, Lr1, Lr9) indukálódik, de a két rezisztens vonalban (Lr1, Lr9) a Tc-étől időben ill. intenzitásban eltérő megjelenést mutat. Érdekes ugyanakkor, hogy az endo-1,3-1,4-glükanázok képviselőjének (ABB96917) indukcióját csak a fogékony Tc genotípus (késői) válaszára találtunk jellemzőnek. Az újabb irodalmi adatok szerint ez a fehérje is hatékony szerepet játszhat a kórokozó gomba elleni védekezésben (Nishizawa et al. 2003, Akiyama et al. 2009).

A kitinázok és glükanázok mellett a rezisztenciagént hordozó Lr1 ill. Lr9 vonalakban igazoltuk az egyelőre még nem egészen tisztázott hatásmechanizmusú PR1 család megjelenését is (legalább két taggal). A PR1 proteinek antifungális hatása régóta ismert, extracelluláris SCP-

doménjük miatt legújabbban membrán- ill. sejtfa-permeabilizáló, endopeptidáz aktivitást tulajdonítanak nekik (Park *et al.* 2010).

Az Lr9 vonal apoplasztikus fehérjemintázatának részletesebb analízise további fehérjecsaldok indukcióját is valószínűsítette a levélrozsda fertőzéssel összefüggésben: Négy izoforma azonosítása utal a hifa- és csíranövekedést egyaránt gátló hatású taumatinszerű fehérjék (PR5) széles körének expressziójára. E fehérjecsald más képviselőinél az irodalomban közvetett sejtmembrán permeabilizáló képességet (Abad *et al.* 1996) és a gombasejtfa 1,3-béta-D-glükánjaihoz való intenzív kötődést, sőt egyes esetekben sejtfa hasító aktivitást detektáltak (Osmond *et al.* 2001, Grenier *et al.* 1999). Egy további PR-proteincsalád, a PR9 mezofillumsejtekben kifejeződő, H₂O₂ termelő típusú (1. klaszterű - Liu *et al.* 2005) szekrécios peroxidázainak megjelenését (öt képviselővel) is sikerült bizonyítanunk, továbbá egy szintén extracelluláris, növényi típusú GDSL-szerű lipáz jelenlétét. Ugyanezen lipáz transzkriptumának szekvenciáját egy levélrozsda-fertőzött Lr9/Tc-búzavonalra specifikus SSH cDNS-könyvtár klónjai között épp az elmúlt évben határozták meg (Lasota *et al.* 2009). A növényi lipáz enzimsoport lehetséges védő szerepét a nektrotróf, de hiperszenzitív reakciót is kiváltani képes *Alternaria* fertőzte *Arabidopsis*-ban (Oh *et al.* 2005) és rozsdafertőzött *Phaseolus*-ban (Lee *et al.* 2009) nemrégiben kezdték feltérképezni. Indukciójukat a bazális és az *R* gén közvetítette rezisztencia szoros kapcsolatának egyik megnyilvánulásaként értelmezik, lehetséges hatásmechanizmusként pedig a spóracsírázás közvetlen gátlását és egyéb indirekt hatásokat (pl. az oxidatív stresszelt membránból kiasított, zsírsav-természetű jelmolekulák képzése) tételeznek fel.

A proteomikailag azonosított PR-családok közül az extracelluláris endo-1,3-glükánázok (PR2) és kitinázok (PR3 ill. PR4) esetében aktivitásvizsgálatokat is végeztünk annak felderítésére, hogy ezen enzimek fokozott aktivitása hozzájárulhat-e az Lr1 és Lr9 vonalak rozsdarezisztenciájának kialakításához. Kimutattuk, hogy a fogékony Tc-ben ugyan 1-2 órával korábban jelentkezik a vizsgált enzimek aktivitásának első hulláma, de mérsékelt szinten marad és 3-4 nap után megkezdődik a lassú csökkenés és az alapállapot szintjére való visszaesés. Ezzel szemben a két levélrozsda-rezisztens vonal apoplasztikus enzimaktivitása ugyan némi késéssel indukálódik, de átlagosan 3 nappal a fertőzés után már messze meghaladja a közel izogén, fogékony vonalban mért aktivitást, és tartósan magasabb szinten is marad. Eredményeink nem bizonyítják, hogy a vizsgált enzimek ténylegesen hozzájárulnak a rezisztencia kialakításához, hiszen endo-1,3-glükánázok és kitinázok más stresszek hatására is indukálódnak. Mivel azonban ezen enzimek képesek a gomba sejtfaának bontására és az

apoplasztban erőteljesen megnövekszik az aktivitásuk, jelenlétüknek közvetlen antifungális hatása lehet. A mára ismertté vált, mintegy 60 eltérő levélrozsdá-rezisztenciagén valamelyikét hordozó, közel izogén búzavonalak közt a szekretált glükánázok és kitinázok kifejeződése jelentősen eltérhet - nemcsak az alkalmazott, fogékony alapfajtaéhoz viszonyítva, hanem a hordozott rezisztenciagén illetve genetikai háttér kombinációja szerint is. Egyes esetekben az Lr1- és Lr9-hez hasonló, erőteljes indukciót írtak le a rezisztens vonalakban, máskor fokozott konstitutív expressziót figyeltek meg (Lr35/Tc), ismét más esetekben (Lr29/ és Lr34/Palmiet vö. Palmiet) viszont a fogékony háttérrel összevethető indukciós aktivitást detektáltak (Anguelova *et al.* 1999, Anguelova-Merhar *et al.* 2002, Kemp *et al.* 1999). Ennek alapján úgy tűnik, hogy bár az említett hidrolázok nem mindig játszanak érdemi szerepet a levélrozsdá elleni rezisztencia kifejlődésében, de erőteljesebben indukált vagy konstitutív expressziójuk révén kiegészítő jelleggel mégis hozzájárulhatnak a rezisztenciához.

A fehérje-szinten kimutatott expressziós változások megerősítésére és esetleges eltérő izoformák indukciójának feltárására az érintett, nagyobb glükánáz és kitináz csoportok esetében (GH 17. és 19. család) génexpressziós vizsgálatokat is végeztünk a fogékony Tc ill. az Lr9 rezisztens vonalon. A tömegspektrometriailag azonosított kitinázok és glükánázok triptikus peptidjeiből levezetett, szűkebb vagy szélesebb specificitású primerekkel néhány izoforma esetében (*Chi1* - II. osztályú; *Cht2* / *Cht4* - IV. osztályú kitinázok; I. és III. klaszterbe (pl. *TaGlb2a*) sorolt endo-1,3-glükánázok) a keresett búza-transzkriptumokat vagy azok szintén annotált, közeli homológjait amplifikáltuk (pl. AB029934, AF112963; DQ078255/DQ090946 és Y18212, AB244638.2, AB244642.1). További klónok szekvenálásával az NCBI fehérje-adatbázisban még nem szereplő 4 új búza kitináz és 3 glükánáz izoforma transzkriptumának jelenlétét is kimutattuk, melyek pontos vagy alig eltérő megfelelői a TIGR EST-adatbázisban már fellelhetők.

Génexpressziós analíziseink (RT-PCR) megerősítették és kiegészítették proteomikai eredményeinket abban az értelemben, hogy igazolják: a levélrozsdá-fertőzés kapcsán indukálódó stresszválaszban egyazon fehérjecsalád többféle izoformája is kifejeződik egyidejűleg, másrészt a proteomikailag feltárt sokféleséget a transzkriptumok analízise tovább bővíti, néhány további, eddig fehérje- vagy érett mRNS-szinten nem ismert génvariáns azonosításával. Proteomikai és transzkripciós vizsgálataink összesítésével sikerült igazolnunk, hogy a megemelkedett apoplasztikus kitináz és endo-1,3-glükánáz aktivitáshoz az Lr9 rezisztens vonalban a *Chi1* és a *TaGlb2b*, *2f* és *2a* gének kifejeződése biztosan hozzájárul.

A genotípusra jellemző expressziós eltérések bizonyítását RT-qPCR révén, míg az eltérő expresszió hátterében álló szabályozási különbségek részleteinek megismerését promóter-analízissel látjuk megvalósíthatónak. Ennek azonban alapvető feltétele a potenciálisan expresszálódó izoformák érdemi elkülöníthetősége, amit jelenleg a búza adatbázisok kódoló és szabályzó szekvenciák terén is fennálló hiányosságai nem tesznek lehetővé.

B.) A kadmiumstressz kapcsán árpa apoplastban indukálódó fehérjeválasz

Egy nehézfémre érzékeny árpafajta, a 'GK Mandolina' kadmiumstressze (0-300 μM Cd^{2+}) kapcsán a levél intercelluláris folyadékának proteomikai analízise drámai változásokat hozott felszínre az 1- és 2-dimenziós fehérjemintázat 10-40 kDa régiójában. Eddigi tömegspektrometriai (MS) eredményeink alapján, melyben 6 különféle, eredendően patogenezissel összefüggésben leírt fehérjecsalád különböző izoformáit azonosítottuk, úgy tűnik, hogy a Cd^{2+} által kiváltott védekezési reakciónak az apoplastban egy általános jellegű stresszválasz is részese. Ennek megfelelően, a kadmium-stresszelt árpa sejtközötti állományban bizonyos PR1 proteinek, továbbá két 1,3-glükánáz (PR2), kitinázok (PR3, PR4) és különösen nagy számban taumatinszerű (PR5) fehérjék intenzitásnövekedését sikerült kimutatnunk, valamint egy a PR17 családba tartozó és egy ezzel homológ, a bázikus szekretált proteinek (BSP) körébe sorolt hipotetikus fehérjét. A szakirodalom alapján várható, indukálódó peroxidázok (PR9) különböző szekretált válfajai nem szerepeltek az eddig analizált minták között.

Az utóbbi két évtized jelátviteli kutatásainak és különösen az elmúlt pár év stresszszignál-interakciókat érintő, mélyebb analíziseinek tükrében úgy tűnik, bizonyos PR fehérjék meglehetősen sztereotípnak tűnő indukálódása a nehézfémstresszekre is jellemző, és az is elképzelhető, hogy a nevezett fehérjéknek valóban releváns és az eredetnél komplexebb helyük lehet a védekezésben. Pár éve igazolták, hogy egy paprika PR1 fehérje, továbbá egy gomba PR3 kitináz heterológ túltermeltetése dohányban (Sarowar *et al.* 2005, Dana *et al.* 2006) széles spektrumú biotikus és abiotikus védettséghez, többek közt jelentős nehézfém-toleranciához (Cd^{2+} és Hg^{2+} - illetve Cd^{2+} és Cu^{2+}) vezet. A kutatócsoport a jelenség hátterében leginkább a *CABPR1* túltermeltetésével feltételezetten együtt járó, nehézfémstresszben is jellemző felborult redoxi-homeosztázist, s az így felgyűlő hidrogén-peroxid védő hatását valószínűsítette. A mi kísérleteinkben azonosított béta-1,3-glükozidáz kapcsán szintén elképzelhető, hogy a PR2-csoport egyes képviselői a kadmiumstressz folyamán másodlagosan fellépő dehidratáció leküzdésében, pl. a glikozilált abszcizinsav-formák felszabadításával vagy más módon is se-

gédkeznek az apoplasztban, bár az ABA-glükozidok hasításáért ma elsősorban a glükohidrolázok I. családját teszik felelőssé (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002, Leubner-Metzger és Meins 1999, Minic 2008).

Kísérleteinkben az alacsony ionerőnél kivonható apoplaszt proteineket vizsgáltuk. Amennyiben az apoplasztban kifejezetten kadmiumra specifikus változásokat szeretnénk detektálni, a sejtfalhoz szorosabban kötődő fehérjefrakciót sem hagyhatjuk ki az elemzésből. Annál is inkább, mert számos publikáció tanúskodik egyes nehézfémek sejtfal-sejtmembrán rigiditására vagy bizonyos szekretált fehérjék adszorbeálódására gyakorolt hatásáról (pl. Hirano *et al.* 1994, Lagrimini *et al.* 1997 ill. Kataoka *et al.* 2003, Scheel *et al.* 2008). A kadmium- ill. nehézfém-specifikusan indukálódó stresszfehérjék kutatását célszerű volna a jövőben a gyökér apoplaszt és az exudátumok elemzésére is kiterjeszteni.

C.) Kísérletek búza apoplaszt referenciatérkép készítéséhez

A stresszfactorok hatásának megbízható proteomikai kimutatásához elengedhetetlen a referenciatérképek elkészítése. Ezért kezdtünk referencia-apoplaszt fehérjetérképezésbe a nemzetközi genetikai és genomikai kutatásokban a búzafajták közt leginkább preferált cv. 'Chinese Spring' egészséges csíranövényein. A kétdimenziós fehérjemintázatból izolált minták MS-analízise 21-ből 11 folt esetében vezetett releváns eredményre, azaz 9, elismerten intercelluláris búza vagy rokonsági köréből származó, homológ fehérje azonosítására:

Köztük funkcionális csoportokat alkotva, a növényi sejtfelszerkezet átalakításában közreműködő fehérjék körében bizonyítottuk egy arabinoxilán-arabino-furanohidroláz (AXAH II, ~AAK21880), egy béta-D-xilozidáz (~ABA92796) és egy, az előbbi két funkciót egyesítő izoenzim (ARA I, ~AAK38481) jelenlétét. Ezeknek az enzimeknek különösen a fűfélékre jellemző, pektinszegény és csekély xiloglukán tartalmú, ún. II. típusú elsődleges sejtfelszerkezet átalakításában van nagy jelentőségük (Dornez *et al.* 2009), mert ott az (arabino)xilánok képezik a pektinek és a kevert kötésű (1→3),(1→4)-β-D-glukánok mellett a hemicellulóz túlnyomó hányadát (Carpita 1996, Fincher 2009). Az azonosított (1,3;1,4)-béta-glukanáz (feltehetően CAA80493) csírázásban és a növekedésszabályozásban játszott szerepe a fejlődő vegetatív szövet megnyúló sejtjeiben szintén bizonyított (Meikle *et al.* 1994). Az ARA I és egy szekretált béta-galaktozidáz (BG904072*) képében pedig egyben olyan enzimeket is azonosítottunk, amelyek a növényi sejtfalban esszenciális szerepű arabinogalaktán proteinek (AGP) cukorkomponenseinek részleges, specifikus hasítása esetén akár endogén elicitoroképzőként is funkcionálhatnak (Etzler 1998), s így az intracelluláris növényi jelátvitelt

serkentetik normál ill. kóréletteni folyamatokban (Hirano *et al.* 1994, Showalter 2001, Hawes *et al.* 2007).

Egy másik csoportot alkot a növény preformált védekezésében a mikrobiális patogének vagy rágó kártevők ellen közvetlenül bevethető fehérjék köre, egy vad gabonaféléből izolált, kettős funkciójú rovar alfa-amiláz inhibitor / endokitináz proteinnel (P15326) homológ búzafehérje, valamint egy – az Lr9 vonal stresszválaszában levélrozsdafertőzés kapcsán már azonosított – endo-1,3-glükánáz (CAI64809) enzim formájában.

Előbbiek mellett igazoltuk egy, a PR17 család képviselővel homológ, s a kadmiummal kezelt árpa apoplasztjában indukált fehérjével (CAA74594) rokon búzaprotein kifejeződését.

Végül, a csíranövény stádium kétdimenziós apoplaszt fehérjemintázatának legdominánsabb, hármastagszó csoportjaként egy normál és kóréletteni vonatkozásban is érdekes proteint azonosítottunk (CAC85479). Ez a fehérje ADP-glükóz-pirofoszfátáz/foszfodiészteráz aktivitása révén az apoplasztban pl. fenoloid anticipinek glikozilálását is elősegítheti (Vermerris és Nicholson 2007). Részletes tömegspektrometriai analízissel igazolni tudtuk, hogy a protein két konzervatív régiója (B és C) és egy sejtadhézióban szerepet játszó KGD motívuma alapján - a multifunkciós germinszerű proteinekhez (GLP) sorolható, s így potenciálisan a PR16 család képviselője (Bernier és Berna 2001).

KITEKINTÉS

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

Első közelítésben akár úgy tűnhet, hogy a több ponton is átfedő abiotikus és biotikus stressz-jelátviteli útvonalakra alapozva, a keresztrezisztencia reményében akár mesterséges úton is célszerű megkísérelni a növény általános védelmi szintjének tartós megemelését (Jonak *et al.* 2004, Maksymiec 2007, Poschenrieder *et al.* 2006). Ezt az utat azért nem tartom járhatónak, mert még ha el is tekintünk a növényegyedre nézve hosszabb távon érvényesülő, esetlegesen káros mellékhatásoktól (pl. csökkenő növekedési és magprodukciós ráta, öregedési folyamatok előtérbe kerülése stb. - Heil *et al.* 2000, Iakimova *et al.* 2006, Maksymiec 2007, Van

Hulten *et al.* 2006), a PR-fehérjék széles körére jellemző antinutritív és allergén potenciállal feltétlenül számolnunk kell.

Az egyes PR-proteineknek több allélja és izoformája létezik, ami kísérleteinkben is megnehezítette a pontos azonosítást. A hasonló vagy akár megegyező funkciót ellátó PR izoformák expressziójának eltérései érdemben befolyásolhatják a védekezési válasz sikerét. Ezért fontos jövőbeni feladatnak tekintjük az adott válaszreakcióban indukálódó izoformák pontos beazonosítását, a védekezéshez való individuális hozzájárulásuk mértékének és időbeliségének meghatározását, továbbá közös ill. eltérő promóterelemek azonosítását.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A.) A levélrozsda-fertőzés kapcsán búzában indukálódó stresszválasz témakörében

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

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

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

1. A kadmium-stresszelt árpa (cv. Mandolina) sejtközi állományában kimutattuk, hogy az egy hetes kezelés során számos fehérje expressziója mutat a Cd-koncentráció függvényében folyamatos változást, általában növekedést. Ezek közül 1D- majd 2D-elválasztás után két 1-3-glükánázt (PR2 család - 1607157A és P15737/AAM75342), két kitinázt (PR3 család - CAA55344 és CAA55345) és további két kitin-kötő fehérjét (PR 4 család - CAA71774, P28814), két PR1 proteint (CAA52893, P35793) és különösen nagy számban taumatinszerű (PR5) fehérjéket (pl. AAB71680, AAK55325, AAK55326) sikerült azonosítanunk. Kimutattuk még egy PR17 proteint (ABV22582) és egy egyelőre ismeretlen funkciójú, de szekvenciája alapján utóbbi családdal rokon, az antimikrobiális BSP fehérjék közé tartozó proteint (CAA74594) jelenlétét is.
2. Ezzel az irodalomban első ízben analizáltuk a kadmiumra adott extracelluláris stresszválaszt proteomikai módszerekkel árpa levélben (Pós *et al.* 2011, *in press*), és a kis ionerővel kimosható frakciót elemezve megállapítottuk, hogy ott a növény általános védekezésében résztvevő, azaz nem a kadmiumra specifikusan reagáló PR fehérjék (is) indukálódnak.

C.) A búza referencia-apoplaszt proteomikai térképezése témakörében:

1. Az egészséges cv. 'Chinese Spring' búza csíranövény apoplasztjának kétdimenziós proteomikai térképezése során eddig 11 folt esetében sikerült releváns, bizonyíthatóan szekretált fehérjének megfelelő homológ szekvenciákat azonosítani. A 11 foltnak megfelelő 9 proteint egyrésze a növényi sejtfallszerkezet átalakításában működik közre (arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II - AAK21880, alpha-L-arabinofuranosidase / beta-D-xylosidase isoenzyme ARA-I - AAK38481,

beta-D-xylosidase - ABA92796, (1,3;1,4)-beta-glucanase - CAA80493, beta-D-galactosidase - BG904072*) és főként normál anyagcsere-folyamatokban érintett vagy pl. endogén elicitorokképzőként funkcionálhat. Egy további körük kifejezetten a mikrobiális kórokozók és rágó kártevők elleni preformált védekezést szolgálhatja (alpha-amylase inhibitor / endochitinase - P15326, putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase - CAI64809). Az azonosított proteinek között szerepel továbbá egy multifunkciós, pl. fenoloid anticipinek glikozilálását elősegítő protein (adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase - CAC85479) és egy ismeretlen, de a PR17 családdal szekvenciálisan rokon fehérje (hypothetical protein - CAA74594).

2. A vizsgált fejlődési stádium apoplasztjában dominánsnak tűnő ADP-glükóz pirofoszforiláziáról (CAC85479) két, a germinszerű proteinekre jellemző konzervatív box (B és C), valamint egy sejtadhézióban szerepet játszó KGD motívum azonosításával valószínűsítettük, hogy a germinszerű fehérjékhez sorolható s így potenciálisan a PR16 család képviselője.

IDÉZETT IRODALOM

1. ABAD L.R., D'URZO M.P., LIN D., NARASIMHAN M.L., RENVENI M., ZHU J.K., NIU X., SINGH N.K., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. *Plant Sci* (1996) 118: 11-23.
2. AKIYAMA T., JIN S., YOSHIDA M., HOSHINO T., OPASSIRI R., KETUDAT CAIRNS J.R. *J Plant Physiol* (2009) 166: 1814—1825.
3. ANGUELOVA V.S., VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z.A. *Physiol Plantarum* (1999) 106: 393-401.
4. ANGUELOVA-MERHAR V.S., VAN DER WESTHUIZEN A.J., PRETORIUS Z.A. *Journal of Plant Physiology* (2002). 159(11): 1259-1261
5. BERNIER F., BERNA A. *Plant physiology and Biochemistry* (2001) 39: 545-554.
6. CARPITA N.C. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1996) 47: 445–76.
7. DANA M.M., PINTOR-TORO J.A., CUBERO B. *Plant Physiol* (2006) 142: 722–730.
8. DENAULT L.J., ALLEN W.G., BOYER E.W. et al. *American Society of Brewing Chemists Journal* (1978) 36: 18-23
9. DORNEZ E., GEBRUERS K., DELCOUR J.A., COURTIN C.M. *Trends in Food Science & Technology* (2009) 20 (11-12): 495-510.
10. DYGERT, S., LI L. H., FLORIDA D. et al. *Analytical Biochemistry* (1965) 13: 367-374.
11. ETZLER M.E. *J. Cell. Biochem.* (1998) Suppl. 30-31: 123–128.
12. FINCHER G.B. *Plant Physiology* (2009) 149: 27-37.
13. GRENIER J., POTVIN C., TRUDEL J., ASSELIN A. *The Plant Journal* (1999) 19(4): 473-80.
14. HAWES M., CELOY R., PRICE I., WEN F., EBOLO J. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* (2007) 146 (4), Suppl. 1, S276.
15. HEIL M., HILPERT A., KAISER W., LINSSENMAIR K.E. *The Journal of Ecology* (2000) 88(4): 645-654.
16. HIRANO Y., TSUMURAYA Y., HASHIMOTO Y. *Physiologia Plantarum* (1994) 92(2): 286-296.
17. IAKIMOVA E., KAPCHINA-TOTEVA V., DE JONG A., ATANASSOV A., WOLTERING E. In: Blume Y et al. (Szerk.): *Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxid and Cell Death in Plants.* (2006) Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Yalta, Ukraine 8-11. 09. 2004. IOS Press, Amsterdam, 2006.

18. INOUE H., NOJIMA H., OKAYAMA H. *Gene* (1990) 96(3): 23-28.
19. JONAK C., NAKAGAMI H., HIRT H. *Plant Physiol* (2004) 36: 3276–3283.
20. KABAI M. (*Szakkolgozat*) *Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar* (2008)
21. KATAOKA T., FURUKAWA J., NAKANISHI T.M. *Biol Plant* (2003) 36, 445-449.
22. KEMP G., BOTHA A-M., KLOPPERS F.J., PRETORIUS Z.A. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1999) 55(1): 45-52.
23. LAEMMLI U.K. *Nature* (1970), 227(5259): 680-685.
24. LAGRIMINI L.M., GINGAS V., FINGER F., ROTHSTEIN S., LIU T.Y. *Plant Physiol* (1997) 114: 1187–1196.
25. LASOTA E., DMOCHOWSKA M., KAWALEK A., NADOLSKA-ORCZYK A., ORCZYK W. *19th ITMI / 3rd COST Tritigen Joint Workshop 2009. (Aug.31-Sept.4. 2009 Clermont-Ferrand, France) Abstracts p. 166.*
26. LEE J., FENG J., CAMPBELL K.B, SCHEFFLER B.E., GARRETT W.M., THIBIVILLIERS S., STACEY G., NAIMAN D.Q., TUCKER M.L., PASTOR-CORRALES M.A., COOPER B. *Mol Cell Proteomics* (2009) 8(1): 19-31.
27. LEUBNER-METZGER G., MEINS F.J.R. In: Datta SK, Muthukrishnan S (Szerk.): Pathogenesis-related proteins in plants. pp 49-76, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 1999.
28. LIU G., SHENG X., GREENSHIELDS D.L., OGIEGLO A., KAMINSKYJ S., SELVARAJ G., WEI Y. *Mol Plant Microbe Interact* (2005) 18: 730–741.
29. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. *J. Biol. Chem.* (1951) 193(1): 265–75.
30. MAKSYMIEC W. *Acta Physiologiae Plantarum* (2007) 29(3): 177-187.
31. MEIKLE PJ, BONIG I, HOOGENRAAD NJ, CLARKE AE, STONE BA. *Planta*(1991) 185: 1-8.
32. MINIC Z. *Planta*(2008) 227(4): 723-740.
33. NEUHOFF V., STAMM R., ELBL H. *Electrophoresis* (1985) 6: 427-448.
34. NISHIZAWA Y., SARUTA M., NAKAZONO K., NISHIO Z., SOMA M., YOSHIDA T., NAKAJIMA E., HIBI T. *Plant Mol Biol.* (2003) 51(1): 143-52.
35. OH I.S., PARK A.R., BAE M.S., KWON S.J., KIM Y.S., LEE J.E., KANG N.Y., LEE S., CHEONG H., PARK O.K. *Plant Cell* (2005) 17(10): 2832–2847.
36. OSMOND R.I.W., HRMOVA M., FONTAINE F., IMBERTY A., FINCHER G.B. *Eur J Biochem* (2001) 268: 4190-4199.
37. PARK S-C., LEE J.R., KIM J-Y., HWANG I., NAH J-W., CHEONG H., PARK Y., HAHM K-S. *Biotechnology Letters* (2010) 32(1): 125-130.
38. PERFUS-BARBEOCH L., LEONHARDT N., VAVADDEUR A., FORESTIER C. *Plant J* (2002) 32: 539-548.
39. POS V., HUNYADI-GULYÁS É., KABAI M., CAIAZZO R., JÓCSÁK I., MEDZIHRADESKY K., LUKÁCS N. (2011): *Acta Alimentaria - An International Journal of Food Science* 40, (Suppl 1) (in press)
40. POSCHENRIEDER CH., TOLRA R., BARCELO J. *TRENDS in Plant Science* (2006) 11 (6): 288-295.
41. RABILLOUD T. *Electrophoresis* (1998) 19: 758-760.
42. ROHRINGER R., EBRAHIM-NESBAT F., WOLF G. *Journal of Experimental Botany* (1983) 34(149): 589-605.
43. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 2nd Ed.; *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.* 1989.
44. SAROWAR S., KIM Y.J., KIM E.N., KIM K.D., HWANG B.K., ISLAM R., SHIN J.S. *Plant Cell Rep* (2005) 24: 216–224.
45. SCHEEL T., PRITSCHK., SCHLOTTER M., KALBITZ K. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (2008) 171(6): 900-907.
46. SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. *Anal Chem* (1996) 68 (5): 850-858.
47. SHOWALTER A.M. *Cell Mol Life Sci* (2001) 58: 1399–1417.
48. VAN HULTEN M., PELSER M., VAN LOON L.C., PIETERSE C.M.J., TON J. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103(14): 5602–5607.
49. VERMERRIS W., NICHOLSON R. In: *Phenolic Compound Biochemistry*, pp. 211-234. Springer Netherlands, 2006.
50. WIRTH S.J., WOLF G.A. *J. Microbiol. Meth.* (1990) 12: 197–205.
51. ZHENG Y., WOZNIAC C.A. *BioTechniques* (1997) 5 (22): 922-926.

Az értekezés témaköréből megjelent publikációk jegyzéke

Folyóiratcikkek

IF-os folyóiratcikkek

Pós V., Hunyadi-Gulyás É., Kabai M., Caiazzo R., Jócsák I., Medzihradzky K., Lukács N. (2011): Induction of pathogenesis-related proteins in intercellular fluid by cadmium stress in barley (*Hordeum vulgare* L.) – a proteomic analysis. *Acta Alimentaria - An International Journal of Food Science* 40, (Suppl 1) (közlésre elfogadva)

Nem IF-os folyóiratcikkek

Pós V., Halász K., Mesterházy Á., Csósz L.né, Manninger K., Hunyadi-Gulyás É., Medzihradzky K., Juhász T., Lukács N. (2005): Proteomic investigation of wheat intercellular washing fluid. *Acta Biologica Szegediensis* 4 (1-2): 31-32.

Konferencia kiadványok

Nemzetközi konferencia (full paper)

-

Nemzetközi konferencia (absztrakt)

Pós V., Manninger K., Halász K., Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Cserhádi M., Duan H., Medzihradzky K., Györgyey J., Lukács N. (2007): Proteomic changes of the wheat apoplast associated with resistance against leaf rust. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology (18-20 July 2007, Budapest, Hungary) *Acta Microbiologica Hungarica* (2007) Vol 54, Suppl. pp. 104-105.

Pós V., Manninger K., Halász K., Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Cserhádi M., Medzihradzky K., Györgyey J., Lukács N. (2007): Proteomic analysis of leaf rust-infected wheat. 2nd World Conference of Stress – "Hans Selye 1907-2007". (23-26 August 2007, Budapest, Hungary) Abstracts pp. 199-200.

Pós V., Manninger K., Halász K., Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Cserhádi M., Duan H., K. Medzihradzky, Györgyey J., Lukács N. (2007): Protein pattern of the wheat apoplast. 1st Central and Eastern European Proteomic Conference – "Proteomics Driven Discovery and Applications" (29-31 October 2007, Prague, Czech Republic). Abstracts pp. 141-142.

Pós V., Hunyadi-Gulyás É., Cserhádi M., Manninger K., Medzihradzky K., Györgyey J. and Lukács N. (2008): From apoplast proteomics to gene identification in hexaploid wheat by analyzing the host response in leaf rust-resistant Lr1 and Lr9 lines. 9th International Congress of Plant Pathology - ICPP 2008 (24-29 August 2008, Torino, Italy) *Journal of Plant Pathology* Vol. 90 (2, Suppl.), p. 202.

Pós V., Szikriszt B., Hunyadi-Gulyás É., Manninger K., Medzihradzky K., Lukács N. (2008): Chitinase Isoenzymes from Proteomic and Transcriptomic Aspects in Wheat Leaf Rust Infection Response in Near-Isogenic Lines of the 'Thatcher' Cultivar. 2nd Central and Eastern European Proteomic Conference (Jena, 12-15. 10. 2008.) Book of Abstracts p. 56.

Pós V., Hunyadi-Gulyás É., Manninger K., Szikriszt B., Rab E., Kabai M., Medzihradzsky K., Lukács N. (2009): Wheat leaf-rust infection response – from apoplast proteomics to transcriptional aspects in near-isogenic lines of the 'Thatcher' cultivar. 3rd International Symposium of 'Plant Protection and Plant Health in Europe' (14-16 May, Berlin, Germany). In: Feldmann F, Alford D V, Furk C: Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors (2009) 192-193, ISBN 978-3-941261-05-1 © Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany

Pós V., Hunyadi-Gulyás É., Kabai M., Caiazzo R., Jócsák I., Medzihradzsky K., Lukács N. (2009): proteomic analysis of the apoplast of cadmium stressed barley leaf (*Hordeum vulgare* L.). 3rd Central and Eastern European Proteomic Conference (06-09. 10. 2009., Budapest, Hungary) Book of Abstracts p. 67.

Szikriszt B., **Pós V.**, Manninger K., Lukács N. (2010): Comparison of the expression of beta-1,3-glucanase and chitinase isoforms in leaf rust resistant and sensitive near-isogenic wheat lines. 2nd International Conference on Horticulture Post-graduate Study (30-31 August 2010, Lednice, Czech Republic). Book of Abstracts p. 6. In: Conference proceedings, ISBN:978-80-7375-419-8)

Pós V., Hunyadi-Gulyás É., Manninger K., Szikriszt B., Cserhádi M., Medzihradzsky K., Györgyey J., Lukács N. (2010): Proteomic and transcriptional Aspects of the Stress Response of Leaf Rust infection in Wheat. 12th International EMBL PhD Symposium -"From Science Fiction to Science Fact: What's next?" (21-23 October 2010, Heidelberg, Germany). Abstract Book p. 81.

Magyar konferencia (full paper)

Pós V., Manninger S.né, Hunyadi-Gulyás É., Cserhádi M., Miklódy D., Györgyey J., Medzihradzsky K., Lukács N. (2007): Levélrozda fertőzéssel asszociált változások a búza apoplaszt fehérjemintázatában. 4. Erdei Ferenc Tudományos Konferencia "A TUDOMÁNY MINDENKIÉ" (Kecskemét, 2007. augusztus 27-28.) Programfüzet (II. kötet) 963-966. o.

Magyar konferencia (absztrakt)

Pós V., Halász K., Mesterházi Á, Csósz Lné, Manninger Sné, Hunyadi-Gulyás É, Medzihradzsky K, Juhász T, Lukács N (2005): Rozsdarezisztenciával asszociáltan megjelenő fehérjék azonosítása a proteomika módszereivel. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak (Budapest, 2005. 10. 19-21.) Összefoglalók - Kertészettudomány pp. 126-127.

Pós V., Halász K., Rab E., Manninger S.né, Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Kovács G., Csósz Lné, Medzihradzsky K., Lukács N. (2006): Búza apoplasztállományának proteomikai analízise. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése (Pécs, 2006. 08. 30. - 09. 02.) Biokémia XXX. évf. 3. szám p. 77.

Pós V., Halász K., Rab E., Kabai M., Manninger S.né, Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Kovács G., Csósz L.né, Medzihradzsky K., Juhász T., Lukács N. (2007): Búza apoplaszt – A proteomika szemszögéből. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok (Budapest, 2007. 02. 20-21.) p. 29.

Pós V., Manninger S.né, Halász K., Kabai M., Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Kovács G., Juhász T., Medzihradzsky K., Lukács N. (2007): Búza apoplaszt proteomikai vizsgálata. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok (Budapest, 2007.03. 12.) Összefoglalók p. 47.

Pós V., Manninger S.né, Halász K., Kabai M., Hunyadi-Gulyás É., Szájli E., Kovács G., Juhász T., Medzihradzky K., Lukács N. (2007): Levélrozsdá-rezisztencia proteomikai elemzése a búza apoplasztzon. VII. Magyar Genetikai Kongresszus (Balatonfüred, 2007. 04. 15-17.) Program Összefoglalók pp. 158-159.

Pós V., Szájli E., Kovács G., Medzihradzky K., Lukács N. (2007): Búza referencia apoplaszt proteomikai térképezése. A Magyar Proteomikai Társaság Vándorgyűlése (Debrecen, 2007. 08. 25-27.) p. 24.

Pós V., Cserhádi M., Hunyadi-Gulyás É., Manninger S.né, Györgyey J., Medzihradzky K., Lukács N. (2007): Közös cisz-reguláló elemek levélrozsdá-fertőzéssel asszociált búza-apoplasztfehérjék génexpressziójában. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007 évi Vándorgyűlése (Debrecen, 2007. 08. 26-29.) Biokémia XXXI. évf. 3. szám p.66.

Pós V., Szájli E., Kovács G., Medzihradzky K., Lukács N. (2007): Búza referencia apoplaszt fehérjemintázatának analízise. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak (Budapest, 2007. 11. 7-8.) Összefoglalók - Kertészettudomány pp. 128-129.

Kabai M., **Pós V.**, Szájli E., Hunyadi-Gulyás É., Caiazzo R., Jócsák I., Kovács G., Medzihradzky K., Lukács N. (2009): Búza (*Triticum aestivum* L.) és árpa (*Hordeum vulgare* L.) apoplaszt proteomikai vizsgálata. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak (Budapest, 2009. 10. 28-30.) Összefoglalók - Kertészettudomány pp. 110-111.

Szikriszt B., **Pós V.**, Manninger K., Lukács N. (2010): Levélrozsdafertőzés kapcsán indukálódó glükánáz és kitináz izoformák azonosítása és génexpressziós vizsgálata közel izogén, rezisztens és fogékony búzavonalakban. Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése (Budapest, 2010. augusztus 25-28.) Biokémia, XXXIV. évf. 3. szám p.39.

Publikációk visszhangja

Hivatkozások külföldi kiadványban:

Chen P., Li Y.-H., Cheng Z.-H., Chen T. (2007): Intercellular 27 kD Protein is a Chitinase Induced by water stress or *Pseudoperonospora cubensis* in Cucumber Leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 33 (6): 581-588.

Li Y.-H., Chen Z.-H., Zhan G.J., Dong J. (2009): Purification and Identification of a Pathogenesis-related Protein in Intercellular Fluids of Cucumber Leaves induced by BTH. *Acta Horticulturae Sinica* 36 (4): 507-512.