

Zárójelentés

Protein lebontó rendszerek szerepének vizsgálata a növények baktériumok ellen kialakuló általános rezisztencia folyamatainak kialakulása során

Bevezetés

A növények számos egymásra épülő mikroorganizmusok elleni védekezési rendszert fejlesztettek. Ezek közül elsőként az általános védekezés (BR) aktiválódik a mikroba növényvel történő kölcsönhatása során. E fontos rezisztencia mechanizmus funkciója minden olyan behatoló felismerése és gátlása, amely a növény tápanyagokban gazdag sejtközötti járataiba jut. E védekezési reakció fontos szerepét (mivel tünetekkel nem jár) csak a hiperszenzitív reakció felfedezése után, évtizedekkel később a közelmúltban ismerték fel. Baktériumok esetén a BR aktiválása olyan baktérium eredetű faktoroknak köszönhető, melyek általánosan jelen vannak a patogén és a nem patogén baktériumokban is (pl. ostor, lipopoliszacharid stb.).

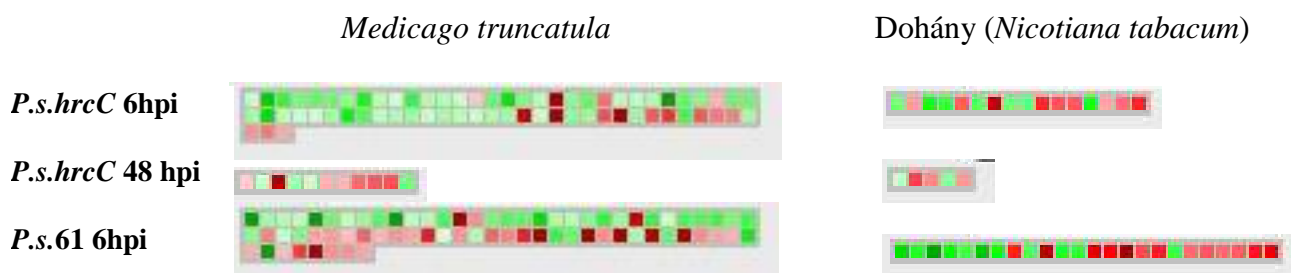
A pályázat során a növényi protein lebontásban (és részben szintézisben) részvevő géncsoport szerepét kezdtük el vizsgálni a BR kialakulása során. Saját és irodalmi adatok azt mutatták, hogy e géncsoport tagjai nagy számban változtatják meg aktivitásukat a védekezés során. Ennek ellenére ennek a fontos géncsoportnak a BR-ben betöltött szerepéről, keveset tudunk. A növényi fehérjelebontó rendszerek a védekezési reakciók (beleértve az általunk vizsgált baktériumok ellen indukálódó általános védekezést) különböző pontjain vehetnek részt a rezisztencia kialakításában. A proteinlebontási folyamatok részt vehetnek a felismerési reakciók létrehozásától kezdve (pl. az elicitor felszabadítása) a válaszreakció szabályozási folyamatainak kialakulásáig (pl. transzkripciós faktorok és egyéb jelátviteli folyamatban résztvevő fehérjék lebontása).

A BR jobb megismerése és a lebontási és szintézis folyamatok egysége miatt több esetben nem csak a lebontás, hanem a fehérjeszintézis egyes elemeinek a szerepét is vizsgáltuk a kísérleteink során.

Eredmények

A proteínázokat kódoló gének kifejeződése

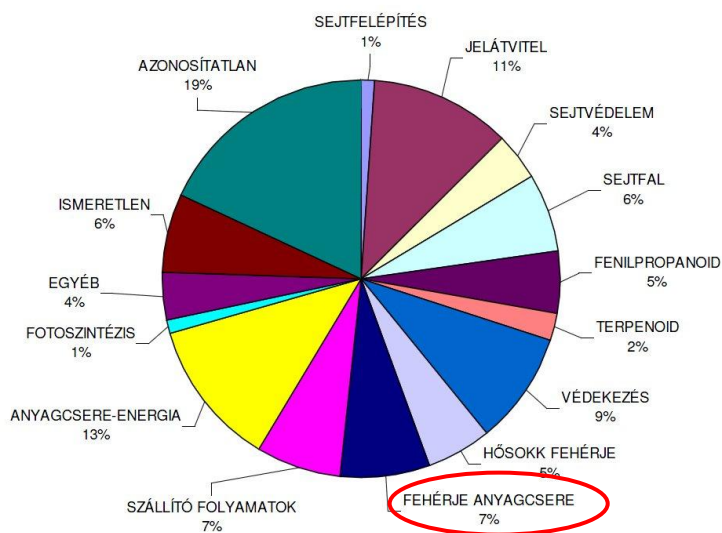
A kutatási ciklus első részében főleg arra kerestük a választ, hogy milyen típusú proteázok, és milyen módon vehetnek részt ennek a BR létrejöttében. Először is saját, különböző (dohány és *Medicago truncatula*) modell növényeken BR és HR (sejtelhalással járó hiperszenzitív reakció) indukálta génexpressziós vizsgálatainkat elemeztük ki (melyeket microarray módszer segítségével végeztük el). A megváltozott aktivitású gének között főleg cisztein, szerin és aszpartil típusú proteázokat és a proteoszómás lebontó rendszer génjeit találtuk meg. A korai, 6 órával a fertőzés után vett mintákban jellemzően nagyobb számban figyelhető meg a gének változása a későbbi (egy-két nappal a fertőzés után vett) mintákéval összevetve. Továbbá a sejtelhalással járó HR-es kapcsolatokban több protein lebontásban szerepet játszó gén aktiválódik a nekrozissal nem járó BR-el összehasonlítva (**1. ábra**).



1. ábra. *Medicago truncatula* és dohány protein lebontásban résztvevő gének átíródása *P. syringae* pv. *syringae* 61 vad (hiperszenzitív reakciót kiváltó) és *hrcC* mutáns (betegséget nem okozó mutáns) baktériumok infiltrálása után 6 és 48 órával (6 és 48 hpi). Az adatokat MAPMAN programmal osztályoztuk és ábrázoltuk. Mindegyik négyzet egy-egy gén kifejeződési szintjét jelöli a vízzel injektált kontrollhoz képest. A piros az aktivációt a zöld repressziót jelöli. A színek intenzitása a változás mértékét jelöli. (Adatok **Bozsó et al. 2009** alapján és **Bozsó Z. és Szatmári Á. nem publikált adatai**)

Ezen kívül együttműködés keretében lehetőségünk volt baktérium ellen hatásos szilikon indukálta védekezési reakcióit vizsgálni paradicsom növényekben. A transzkriptoma vizsgálatok 16 megváltozott aktivitású gént mutattak ki, melyek között szintén találtunk protein lebontással kapcsolatos gént, mégpedig ubiquitin protein ligázt (**Ghareeb et al. 2011**).

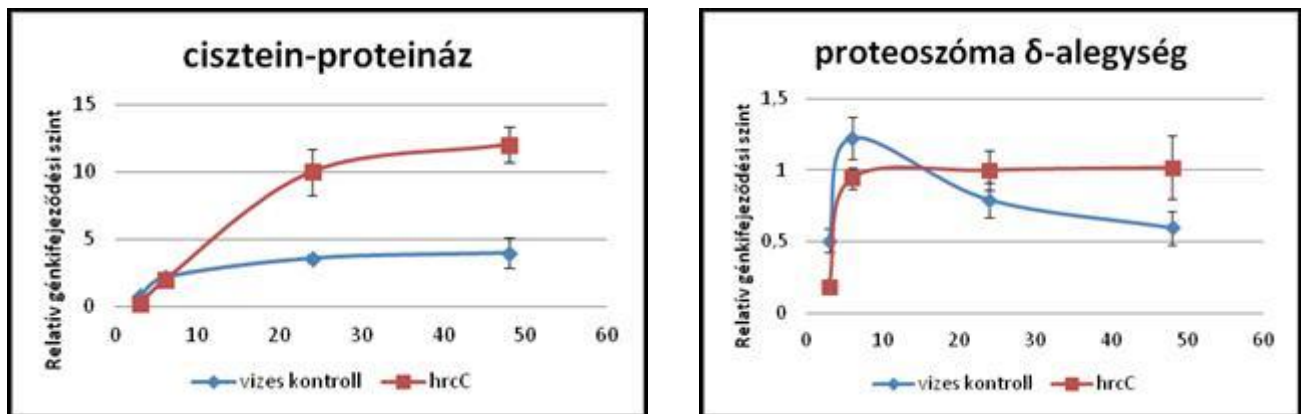
Működésük és evvel kapcsolatban átíródásuk jobb megismerés érdekében a protein anyagcserében résztvevő gének transzkripcióját időben követtük az általános rezisztencia baktériummal történt aktivációját követően. Ehhez dohánylevelekből szubtrakciós módszerrel korábban azonosított BR alatt aktiválódó közel százhetven génből a protein lebontásban és szintézisben résztvevőket választottuk ki (**2. ábra**).



2. ábra. Dohányból izolált, BR alatt 6 és 48 órával a fertőzés után aktiválódó gének funkcionális megoszlása. (**Szatmári Á. nem publikált adatai**)

Ennek érdekében specifikus primereket terveztünk protein anyagcsere génekre majd valós idejű PCR segítségével mértük az átíródásuk szintjét. A dohánylevelekben BR-t indukáltunk a *Pseudomonas syringae* HR-negatív (*hrcC* mutáns) törzsével majd különböző időpontokban két napon keresztül vett mintákban mértük a génexpresszió mértékét. Az így kapott eredmények azt mutatták, hogy jellemzően a cisztein típusú proteázok aktiválódtak a

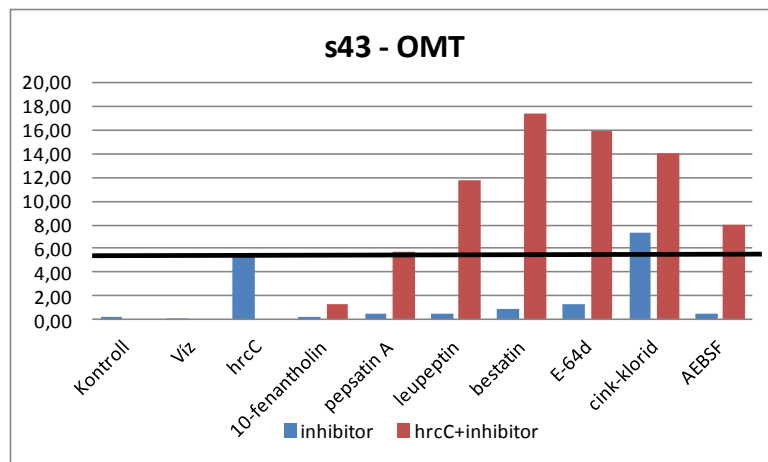
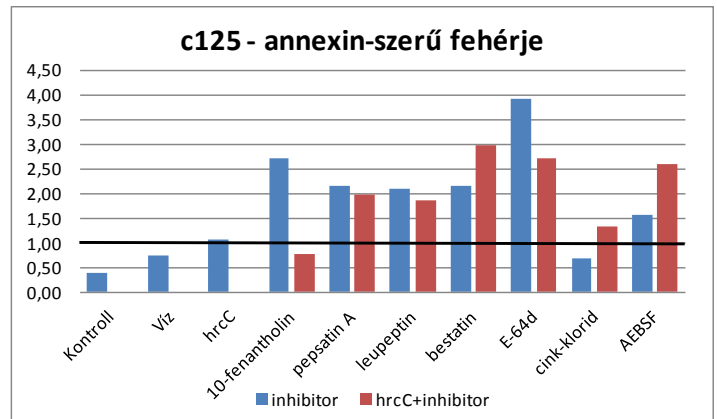
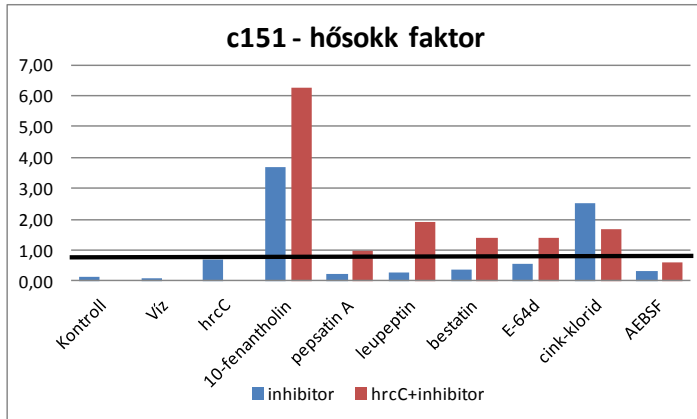
legnagyobb mértékben az általános védekezés során, ami egybecseng a proteínáz gátlókkal kapott eredményeinkkel (lásd később). A cisztein típusú proteázok átíródása a fertőzés után vett egy és kétnapos mintákban mutatott jelentős különbséget a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy ezek a BR későbbi szakaszában játszhatnak szerepet. Olyan géneket is sikerült azonosítani, amelyek – legalábbis bizonyos korai időpontokban – csökkent aktivitást mutattak a BR alatt a vizes kontrollhoz viszonyítva. Ilyen volt például egy proteozóma alegység-gén is. Ezen géneknek a kifejeződési szintje a fertőzést követő 24. órában a kontroll vízzel kezelt mintákéban mért szint fölé emelkedett. (3. ábra)



3.ábra. Cisztein proteináz és proteozóma alegység gének kifejeződésének változása a *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* (piros vonal), illetve vízzel (kék vonal) injektált dohány levelekben a fertőzéstől eltelt órák függvényében. A függőleges tengelyen relatív (konstitutív aktin génhez viszonyított) génkifejeződési szinteket mutatnak a kezeletlen kontrollnövényekben mért génkifejeződési szinthez képest.

Proteináz gátlók hatása a BR folyamataira

Annak érdekében, hogy megállapítsuk milyen típusú proteínázok játszhatnak szerepet a BR kialakulásában különböző proteínázokat gátló inhibitorok is használtunk. Ezek hatását a BR különböző marker folyamataira vizsgáltuk: pl. a BR alatt aktiválódó gének aktivitására, és a sejtfalerősítést jelző kallóz beépülésre. (Inhibitorok használata esetén a baktériumok aktivitás változását és szaporodását nem vizsgáltuk, mivel az inhibitorok hatását nem tudtuk kizárni a baktériumra). A használt proteínáz gátlók a proteázok különböző típusaira hatnak és így együtt jól átfogják az eltérő lebontási specifikussággal rendelkező proteázokat. A cisztein-proteázok hatását E-64-d-vel és cink-kloriddal, a szerin-proteázokat pedig AEBSF-fel blokkoltuk. Mindkét proteáz-típusra gátló hatást fejt ki a leupeptin. Ezekon kívül fenantrolinnal a metalloproteázok, pepsatinnal az aszparaginsav-proteázok, bestatinnal az aminopeptidázok aktivitását mérsékeljük. A kísérletekben a proteáz gátlókat magukban vagy a BR-t kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns (HR-negatív) baktériummal injektáltuk dohánylevélbe. Összesen tizennégy különböző gén átíródását követtük a proteáz gátlókkal történt kezelést követően (a 4. ábra ebből néhány jellemző példát mutat). Az eredmények alapján azt általánosan megfigyelhető volt, hogy a proteáz gátlók a gének aktivitását a BR kialakítása során nem gátolták jelentősen. Ezzel szemben a gének aktivitása számos esetben nőtt, ha a gátló szerek valamelyike jelen volt. Egyes esetekben a proteínáz gátlók önmagukban (a védekezést aktiváló baktérium sejtek jelenléte nélkül is) a gének átíródásának növekedését idézték elő. Főleg a cisztein és az aminopeptidáz csoportba sorolt proteázokat gátolni képes inhibitorok ilyen jellegű hatása volt jellemző. Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy egyes növényi proteázok főleg a védekezési folyamatok negatív regulációjában vehetnek részt.



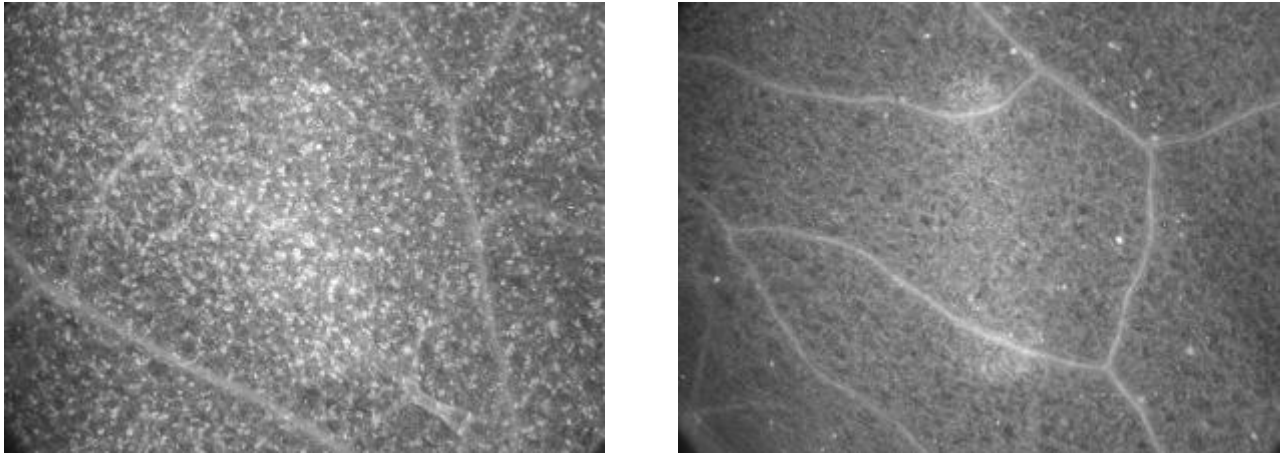
4. ábra: Néhány jellemző példa a proteázgátlók hatására a BR korai szakaszában (fertőzést követő 6. óra) aktiválódó gének aktivitására. A vizsgált gének kifejeződési szintjét a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin génkifejeződési szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk (függőleges tengely). Az egyes gátlószereket a vízszintes tengelyen tüntettük fel (fenantrolin: metalloproteináz, pepsatinA: asparaginsav-proteináz, leupeptin: cisztein- és szerin-proteináz, bestatin: aminopeptidáz, E-64d és cink-klorid: cisztein-proteináz, AEBSF: szerin-proteináz). A kontroll a nem injektált, a víz a vízzel injektált, a hrcC a *Pseudomonas syringae* hrcC BR-t indukáló baktériummal injektált levélben mért értéket jelöli, a csak inhibitorral kezelték kék, az inhibitor és hrcC mutáns baktérium keverékkel kezelték piros színnel kerültek jelölésre. Az ábra két-két ismételt kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja. A fekete vízszintes vonal a gátlószerek nélküli *Pseudomonas syringae* hrcC-val injektált levélben indukálódó génextpressziós szintet jelöli.

Sejtfali kallózbeépülés változása a proteínázgátlók alkalmazásának hatására

A génszintű változásokon kívül követtük azt is, hogy miként alakulnak olyan BR-hez kapcsolható folyamatok, mint például a sejtfalba történő kallóz beépülés, ha különböző típusú inhibitorokat használunk.

Mivel előkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a dohánylevelekben nem sikerül megbízhatóan kivitelezni a kallóz anilin-kékkel való megfestését, ezért modellnövényként ehhez a kísérletsorozathoz *Arabidopsis*-t használtunk. A dohánynövényeknél fentebb leírt génaktivitás mérésekhez alkalmazotthoz hasonló kezeléskombinációkat alkalmaztunk az *Arabidopsis*-ok esetében is. Abszolút kontrollként bizonyos leveleket kezeletlenül hagytunk, míg másokat vízzel, baktériumszuszpenzióval (*P. syringae* pv. *syringae* hrcC), proteínázgátlóval, illetve baktériumszuszpenzió és proteínázgátló keverékével infiltráltunk. (Azokban az esetekben, ahol az adott inhibitor nem vízben oldódott ott a megfelelő oldószer végkoncentrációjának megfelelő kontrollokat használtunk). Ebben a kísérletbeállításban

használt inhibitorok a pepstatin, leupeptin, bestatin, E-64d, cink-klorid, AEBSF, TPCK, E-64, jodoacetamid, N-etil-maleimid, aprotinin és PMSF voltak. Mintákat a kezelést követően 24, illetve 48 órával vettünk. A kísérletben részt vevő növények leveleit anilin-kékkel festettük, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével kezeléstípusonként, illetve mintavételi időpontonként 4-4 mintát vizsgálva jellemeztük őket. A kallózbeépülés mértékét egy négyfokozatú skálán osztályoztuk. Az **5. ábra** egy mikroszkópos példát mutat be jodoacetamiddal (cisztein típusú proteineket gátló anyag) történt proteináz gátlás hatását a kallóz beépülésre.



5. ábra: Fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek anilin-kékkel megfestett *Arabidopsis* levelekről. Bal oldalon *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutánsal fertőzött, jobb oldalon pedig ugyanezen baktériumnak jodoacetamiddal (cisztein típusú proteineket gátló anyag) kiegészített szuszpenziójával kezelt minta látható. A minták a kezelést követő 24. órában kerültek preparálásra. A sejtfalakba berakódott kallóz a képeken világos, pontszerű foltokként jelenik meg. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatók.

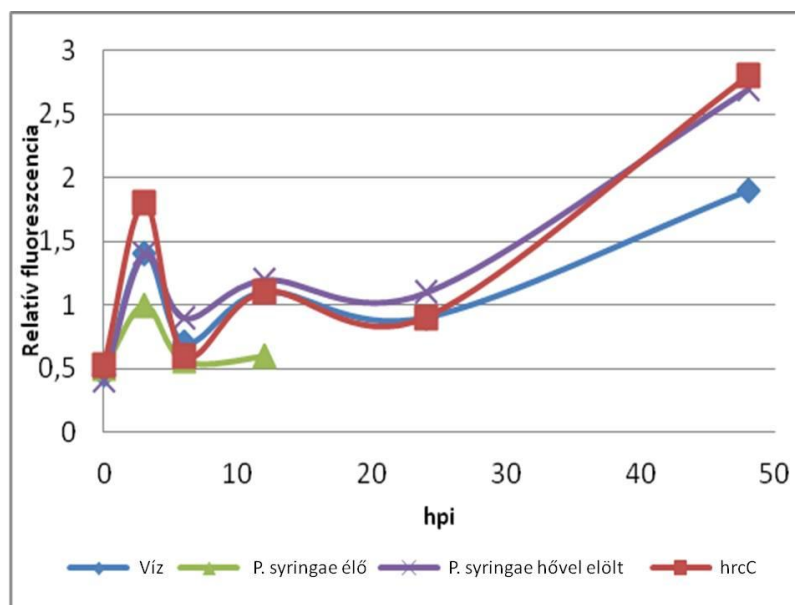
A szerin-proteinázgátlók közé tartozó AEBSF és aprotinin, valamint a cisztein-proteinázokat gátló cink-klorid, jodo-acetamid és N-etil-maleimid mind 24, mind 48 órával a fertőzést követően gátolta a kallózbeépülési folyamatot a BR során tapasztalható képest. A cisztein- és szerin-proteináz inhibitoroként is használható leupeptin viszont csak 24 órával a fertőzés után mutatott ilyen hatást. A jodo-acetamiddal és az N-etil-maleimiddal kombinált baktériumos fertőzés hatására egy nappal később lényegében alig volt megfigyelhető a kallózbeépülés a vizsgált mintákban.

Az inhibitorok önmagukban is indukálhattak kallóz beépülést, ami a proteinázok negatív szabályozó funkcióját jelzi a korábbi génexpressziós vizsgálatokhoz hasonlóan. A folyamatok összetettségét jelzi, hogy voltak olyan inhibitorok is melyek a baktériummal együtt gátló hatást fejtettek ki viszont önmagukban kallóz beépülést indukáltak. Egy nappal a kezeléseket követően ugyanis a vizes kontrollhoz képest több kallóz képződött azokban a levelekben, amelyeket E-64d (cisztein), AEBSF (szerin), TPCK (cisztein) és E-64 (cisztein) proteináz-inhibitorral kezeltünk. Két nap elteltével ilyen hatást a leupeptin, az AEBSF, a TPCK és a jodo-acetamid esetében lehetett megfigyelni.

A növényi proteináz aktivitás változás mérése a BR kialakulása során

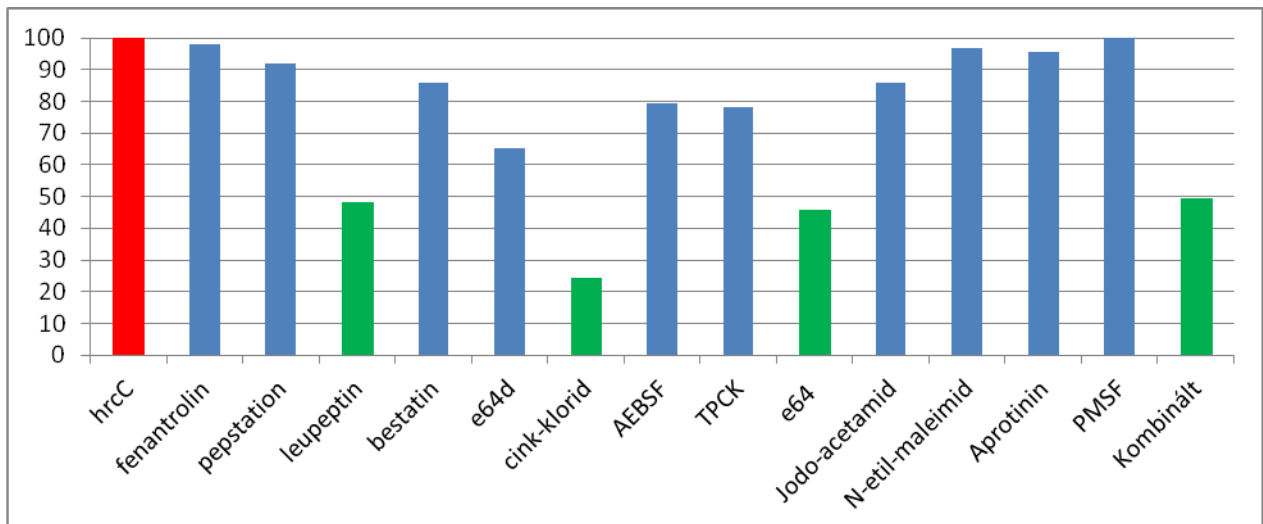
Céljaink között szerepelt, a proteináz gátlók BR-génekre gyakorolt hatásainak vizsgálata mellett a növényekben aktívan működő egyes proteinázok aktivitásának mérése is. A különböző proteináz-aktivitások dinamikájának méréséhez proteinázok hatására aktiválódó fluoreszcens szubsztrátot használtunk. A dohány növényben a BR-t *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns és hővel elölt *P. syringae* pv. *syringae* injektálásával aktiváltuk. Összehasonlítás

céljából HR-t okozó vad típusú *P. syringae* pv. *syringae* baktériumokat is infiltráltunk a levelekbe. A mintákat a kezelés időpontjában, majd ezt követően 3, 6, 12, 24 és 48 órával vettünk, és dolgoztunk fel. A különböző proteinázok aktivitását különböző, az egyes proteinázok aktivitásainak megfelelő pH értékű pufferekben mértük. A mért fluoreszcencia értékeket a kezeletlen (negatív) kontrollban mért értékekre normalizáltuk és a friss levéltömeg alapján milligrammra vetítettük. A mérések során eddig abban a pufferben kaptuk a legmegbízhatóbb eredményeket, mely a cisztein proteinázok számára biztosít optimális feltételeket. Az **6. ábra** a növényben mért proteináz aktivitás papain típusú (ugyancsak cisztein típusú) proteinázok méréséhez előírt pufferrel kapott értékeket jelölik. A BR során a proteáz aktivitás a fertőzést követő 3. és főleg 48. órában mutatott magasabb értéket a kontrollhoz képest. A HR kialakítására alkalmas *P. syringae* pv. *syringae* fertőzés után 12 órával a proteináz aktivitás mértéke számottevően lecsökken a többi kezelés hatásához képest, holott a leveleken tüneteket csak pár órával később lehet megfigyelni.



6. ábra. Papainnal (cisztein típusú proteináz) azonos pH optimummal rendelkező proteinázok aktivitási dinamikája dohányban különböző kezelések hatására a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, egységnyi levéltömegre vonatkoztatva. A vízszintes tengelyen a fertőzéstől eltelt órák száma látható, a függőlegesen pedig a proteináz aktivitással arányos relatív fluoreszcencia értékek. Kezelések Víz: kontroll, *P. syringae* élő: *P. syringae* pv. *syringae* vad típusú HR-t indukáló, *P. syringae* hővel elölt: *P. syringae* pv. *syringae* elölt vad típusú BR-t indukál, hrcC: *P. syringae* pv. *syringae* hrcC mutáns BR-t indukál. Az egyes értékek három minta átlagát jelölik. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szórásból származó hibahatárok nincsenek feltüntetve (0,01 és 0,09 közé tehetők). A HR-t kiváltó élő *P. syringae*-vel infiltrált mintából a szövetelhalás miatt 12 óra után már nem lehetett mintát venni.

Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az általunk vizsgálni kívánt proteinázok közül melyeknek lehet szerepe a fentebb leírt aktivitás változásokban a proteináz aktivitás mérésünket különböző típusú proteinázokat gátló inhibitorokkal egészítettük ki a *P. syringae* pv. *syringae* hrcC mutáns baktériummal kezelt növényekből a fertőzés utáni 48. órában vett minták mérése során (**7. ábra**).



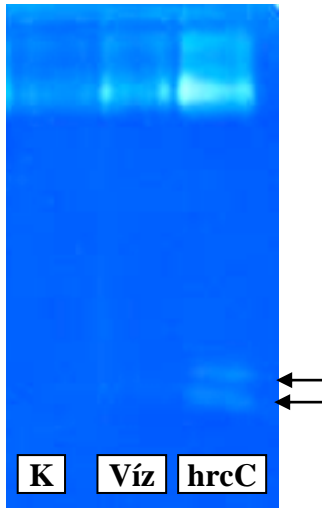
7. ábra. *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériumszuszpenzióval infiltrált dohánylevelekből a fertőzést követő 48. órában vett mintákban mért relatív proteinázaktivitás különböző proteináz-gátlószerek hatására. A vízszintes tengelyen a különböző proteinázgátlók nevei vannak feltüntetve. A „kombinált” minta az összes általunk vizsgált proteinázgátlót tartalmazza. A proteinázgátló nélküli mintában (*hrcC*) mért értéket tekintettük 100-nak. Az egyes kezelések ennek százalékban kifejezett értékeit mutatják. Az 50%-nál kisebb aktivitású kezelések (leupeptin, cink-klorid, e64 és kombinált) értékeit zölddel emeltük ki. Az ábrán három technikai ismétlés átlaga látható.

Az egyes inhibitorok gátló hatását a kezeletlen minta értékéhez viszonyítottuk. A leupeptin, a cink-klorid és az e64 kódjelű készítmény használata mellett a proteinázaktivitás mértéke több mint felére esett vissza (48,44%, 24,22%, 45,96% a felsorolás sorrendjében). Az összes általunk vizsgált proteináz-gátlót tartalmazó „kombinált” gátlószerezellel az aktivitás a „tisztá minta” 49,37%-a volt. Ezek az eredmények, mivel mind a három hatásos inhibitor cisztein és szerin típusú proteinázokat gátol a korábbi eredményekkel hasonlóan az ilyen típusú proteinázok aktiválódását és esetleges védekezésben betöltött szerepét sugallja.

Növényi proteináz mintázat változás kimutatása a BR alatt

A proteinázok megjelenésének változását a BR alatt kétféle módon is tudtuk detektálni. Egyrészt poliakrilamid gélelektroforézis után megfelelő szubsztrát jelenlétében a proteináz aktivitást detektáltuk a gélben. Ezzel a módszerrel konstitutívan aktív, kontrollban is jelen lévő fehérjebontó aktivitás mellett ki tudunk mutatni a fertőzés után 24-48 órával kialakuló, BR alatt aktiválódó proteináz aktivitást mutató fehérjéket is (**8. ábra**). Ezek az aktivitás változások egybe estek a korábban cisztein proteinázokkal génkifejeződéssel kapott eredményekkel.

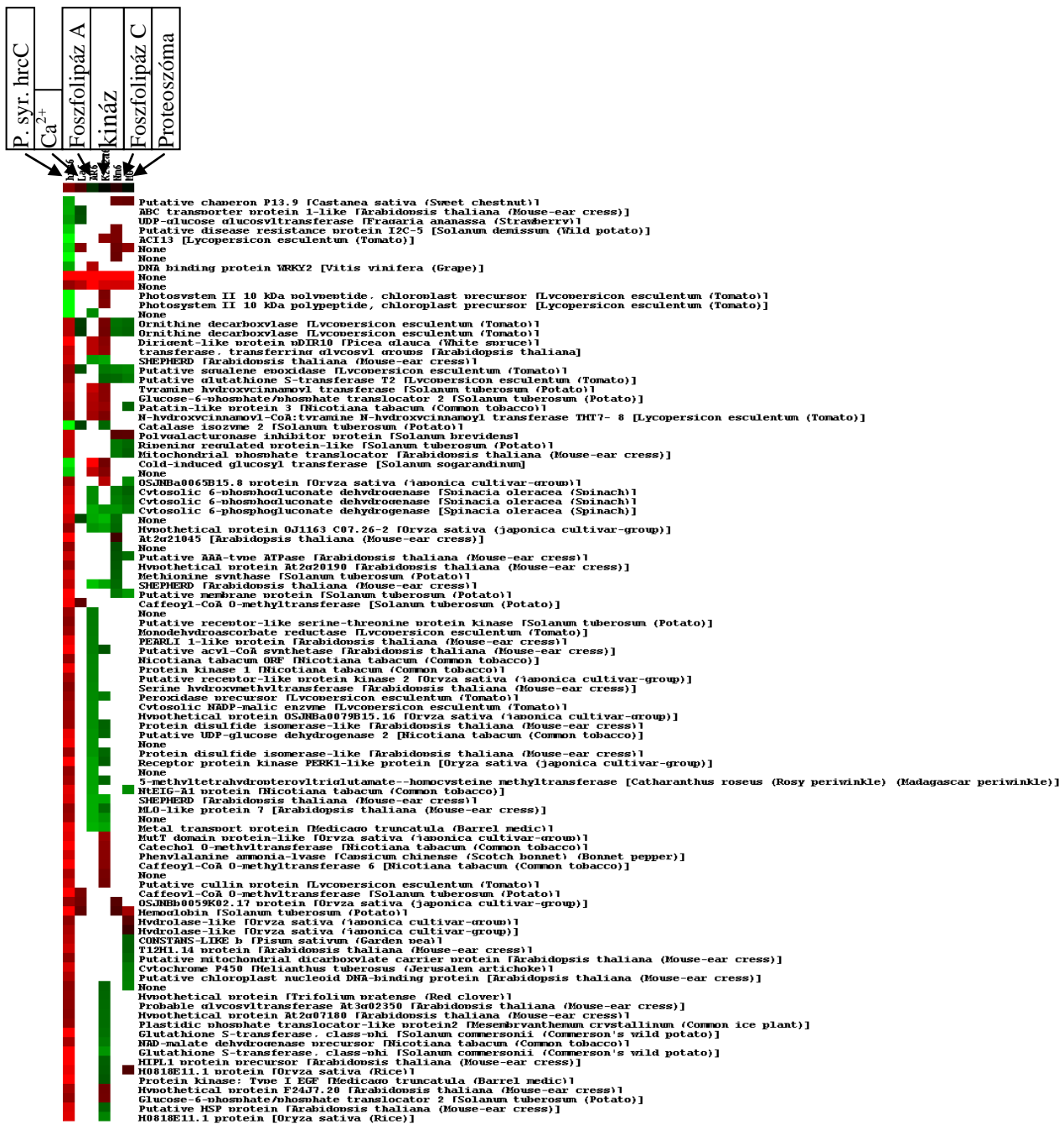
Másik módszerünkkel a dohány sejten kívüli apoplaszt fehérjéit választottuk el kétdimenziós elektroforézissel. Az újonnan megjelent fehérjék között a tömegspektrométeres detektálás után proteinázokkal homológ fehérjét is azonosítottunk (NtPRp27), mely a védekezés alatt a növényi sejtből transzport mechanizmus segítségével jut ki a baktérium elleni védekezés fő a sejt közötti apoplasztba (Szabó et al. 2012).



8. ábra. Proteináz aktivitás változás kimutatása poliakrilamid gélben. A BR-t *P. syringae* 61 *hrcC* baktérium dohánylevélbe infiltrálásával aktiváltuk. A mintákat 48 órával a fertőzés után gyűjtöttük. A proteináz detektálása a gélbe kevert zselatin szubsztrát segítségével történt. K= kezeletlen, Víz=vízzel infiltrált. *hrcC*=*P. syringae hrcC* mutánsal injektált.

A proteozómás fehérjelebontás és más jelátviteli folyamatok gátlásának hatása a BR indukálta génexpressziókra

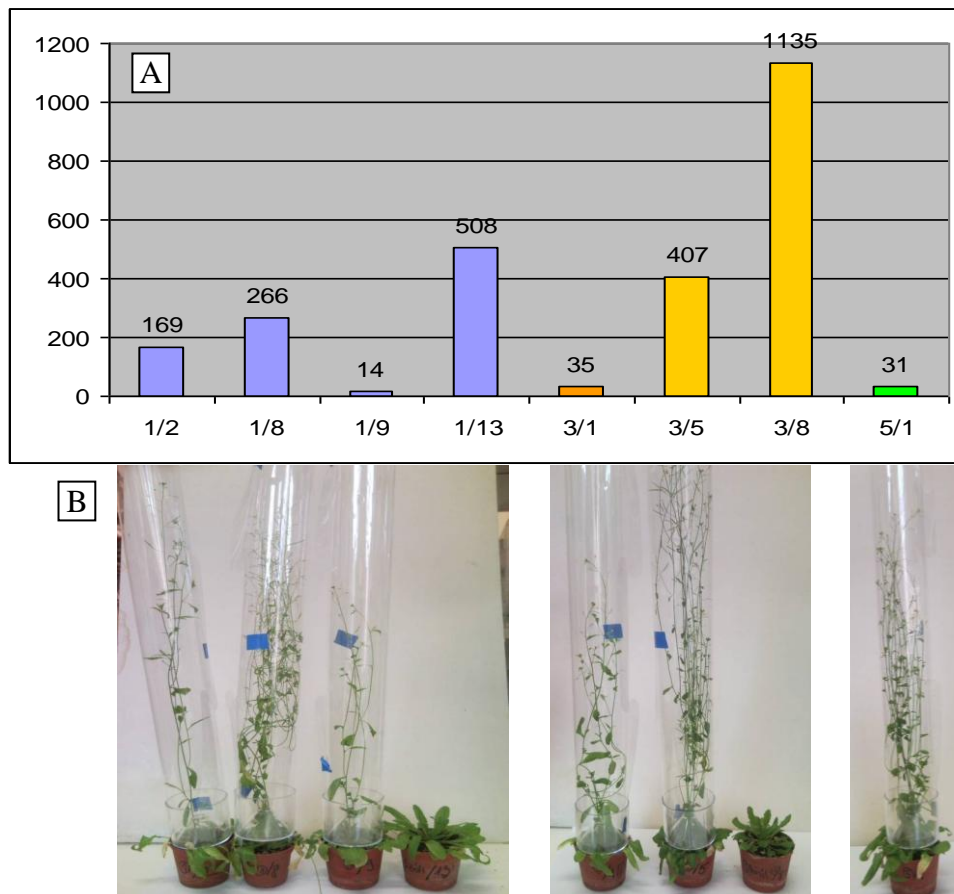
A proteinázok beleértve a proteozómás lebontást is közvetve vagy közvetlenül befolyásolhatják a jelátviteli folyamatokat és végső soron a gének kifejeződését. Lehetőségünk volt néhány jelátviteli folyamat gátlásának és a proteozómás lebontás blokkolásának a hatását megnézni a dohány gének expressziójára microarray módszerrel. (A dohány gének expressziójának vizsgálatához, mivel a kísérletek idején nem állt rendelkezésre dohány microarray, burgonya chip-et használtunk, ami a nagyfokú genomi hasonlóság miatt volt használható). A BR-t a korábbiakhoz hasonlóan a *P. syringae hrcC* mutánsával aktiváltuk, melyet különböző inhibitorokkal egészítettünk ki. A vizsgálatokban négy különböző jelátviteli, illetve egy fehérjelebontást gátló inhibitort használtunk (LaCl₂ – kalcium-ion beáramlás; arisztolochiasav – foszfolipáz-A; neomycin-szulfát – foszfolipáz-C; K252a – kinázok; MG115 – proteozóma). Hat órával a fertőzés után 547 gén változtatta meg az aktivitását a BR-t indukáló baktérium hatására és ebből 99 (18%) expresszióját befolyásolta egy vagy több gátlószer (**9. ábra**). A proteozóma gátlás 29 BR alatt megváltozott aktivitású gén expresszióját befolyásolta, mégpedig többnyire csökkentette a kontrollhoz képest (20 gén esetében a 29-ből). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a fertőzés utáni 6. órában a proteozómás rendszer főleg a BR pozitív regulációban játszik szerepet. A proteozóma inhibitor által befolyásolt BR gének között volt többek között elsődleges és másodlagos anyagcsere, hormon háztartás, jelátviteli folyamatok (receptor kináz) és más proteázok génjei is. A fehérjelebontási rendszer többi inhibitor által vizsgált útvonallal is mutat közös szabályozási mechanizmust. A legszorosabban foszfolipáz C által szabályozott útvonallal lehet kapcsolatban mivel a megváltoztatott gének többsége közös (17 a 29-ből, 59%) és a változás iránya is többnyire megegyezik.



9. ábra *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns baktériummal, illetve ezzel egy időben különböző szignál és proteoszóma inhibitorokkal dohánynövényből a kezelést követő 6. órában vett mintákból készült microarray vizsgálat (TIGR Potato 10K cDNA Array) eredményének grafikus megjelenítése. Kezelések, illetve az általuk gátolt folyamatok rövidítései *P. syr hrcC* = *P. syringae* pv. *syringae* hrcC indukáló baktérium; Ca²⁺ = *P. syr hrcC*+kalcium-ion beáramlást gátló; foszfolipáz A = *P. syr hrcC*+foszfolipáz A gátló; kináz = *P. syr hrcC*+ kináz inhibitor; Proteoszóma = *P. syr hrcC*+proteoszóma gátló). Az egyes kezelésekhez tartozó négyzetek színe az egyes gének regulációjának irányát (piros = fokozódó; zöld=csökkenő) jelöli a kontrollhoz képest (a *P. syringae hrcC* esetében a vizes kontrollhoz, az inhibitorok esetében a *P. syringae hrcC*-hez viszonyítva). A szín mélysége a reguláció mértékével arányos. (Az ábrát a Cluster 3,0 és a Treeview programok segítségével készítettük)

Protein lebontásban és szintézisben résztvevő dohány géneket túltermelő Arabidopsis növények előállítása

A túltermeltetéshez kiválasztott gének a dohányból korábban szubtrakciós módszerrel izolált BR alatt aktiváló gének (**2. ábra**) közül lettek kiválasztva (proteaszómás lebontás elemei és riboszóma alegységek, összesen 7db). A kiválasztott gének teljes cDNS-ét *Agrobacterium* expressziós vektorba klónoztuk. A szekvencia ellenőrzése után a plazmidokat a növényi transzformációhoz *Agrobacterium*-ba juttattuk be. A fehérjék expresszióját *N. benthamiana* levelekben ellenőriztük átmenti túltermelés során Western blot segítségével (a fehérjékre épített tag-ek felismerése alapján). A konstrukciókkal stabil növényi transzformánsokat állítottunk elő *Arabidopsis* növényekben. A 7 konstrukcióból a jelentés készítéséig 5 esetben sikerült túltermelő növényeket előállítani. A túltermelő növények különböző mértékben expresszálták a bejuttatott dohány géneket. A magas kifejeződés fenotípusosan a virágzás késleltetésével járt együtt (**10. ábra**). A proteaszómás rendszer elemeit túltermelő egyes növényi vonalakban teszteltük a kompatibilis baktérium szaporodását. A *P. tomato DC3000* sejt száma a fertőzést követő 3. napon ezekben a transzgenikus növényekben alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (adat nem mutatja), ami a proteaszómás rendszer BR-ben betöltött negatív szabályozását feltételezi.



10. ábra Protein anyagcserével kapcsolatba hozható dohány gének túltermeltetése *Arabidopsis* növényekben. A) Az expresszió szintje különböző konstrukciókkal transzformált növényekben a kontroll konstitutív gén kifejeződéséhez képest. Túltermelt dohány fehérjék: 1=riboszóma alegység, 3=ubiquitin szállító fehérje, 5=proteaszóma alegység. B) A növények fenotípusa. A magasabb transzgen kifejeződés későbbi virágzást eredményezett.

Protein lebontásban és szintézisben résztvevő gének csendesítése

A protein anyagcsere gének védekezési reakciókban történő részvételét géncsendesítési kísérleteink folytatásával is teszteltük. A géncsendesítéshez a korábbi dohány növényekkel végzett általános rezisztenciával kapcsolatba hozható génizolálási eredményeink alapján (**2. ábra**) választottuk ki a BR alatt aktiválódó, fehérje anyagcserében résztvevő géneket (ezek részben átfednek a fentebb leírt túltermeltetésnél felhasznált génekkel). Összesen 11 db gén csendesítését végeztük el (**1. táblázat**). Ezek között voltak különböző típusú proteázok, és a proteaszómás lebontás elemei továbbá néhány proteinszintézisben résztvevő riboszóma alegység is.

1. táblázat. *N. benthamiana*-ban géncsendesítéshez használt fehérje anyagcserében résztvevő gének listája

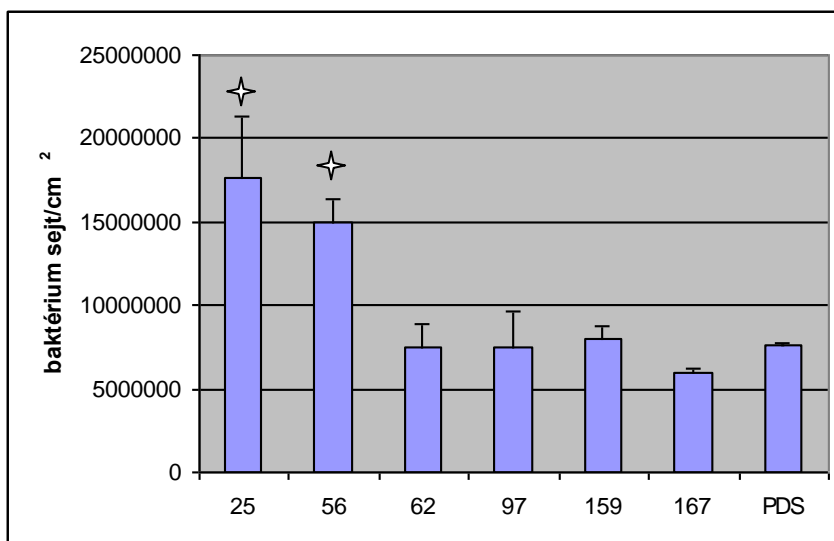
1 c25	cisztein proteáz
2 c56	riboszóma protein
3 c62	riboszóma protein
4 c65	phytophthora-gátolt proteáz
5 c97	Ubiquitin szállító protein
6 c120	proteaszóma alegység
7 c127	riboszóma alegység
8 c114	szubtilizin
9 c159	cisztein proteáz
10 C161	ubiquitin extension fehérje
11 c167	Aszpartil aminopeptidáz

A géncsendesítési kísérleteket *Nicotiana benthamiana* növényeken végeztük TRV vírus segítségével, mivel ebben a rendszerben sikerült nagy hatékonyságú géncsendesítési módszert alkalmaznunk. A dohány (*Nicotiana tabacum*) gének *N. benthamiana* homológjait vizsgáltuk. A tizenegy különböző gén egy-egy szakaszát építettük be vírus vektorba, melyet *Agrobacterium* infiltrálásának segítségével juttatunk a növényi szövetekbe. A géncsendesítés hatásosságának jelzéséhez a levelek kifehéredését okozó marker gén (PDS) mellé klónoztuk a génszakaszokat. A géncsendesítés hatásosságát a levelekből vett mintákból végzet RT-PCR módszerrel valós idejű PCR-el is ellenőriztük. Egyes gének csendesítése fenotípusos változásokat is kiváltott a növényekben (**11. ábra**). Így a ubiquitin proteaszómás fehérjelebontó rendszer egyes elemeinek csendesítése szövetek pusztulásával és számos esetben a növény teljes elhalásával járt együtt (pl 120-as klón). Egyes riboszóma alegységek géncsendesítése viszont rövid szártagok kialakulását, így kisebb méretű növényeket eredményezett (pl. 56-os klón).



11. ábra. Különböző, protein szintézisben és lebontásban résztvevő gének csendesítése *Nicotiana benthamiana* növényekben és ennek fenotípusos hatásuk. A kép a vírusfertőzés után 3 héttel készült. A számok az egyes csendesíteni kívánt gén darabját tartalmazó inszerteket jelölik. 56=riboszóma alegység, 97=ubiquitin szállító protein, 120=proteoszóma alegység, cisztein proteáz BAK=védekezésben résztvevő receptor kináz (pozitív kontroll), PDS=protein anyagcsere gén inszert nélküli kontroll. A levelek fehéredését a PDS marker gén (fitoén-deszaturáz gén) okozza. Az 56 –os esetén a növények törpülését, a 120-as esetén a növények elhalását lehetett megfigyelni.

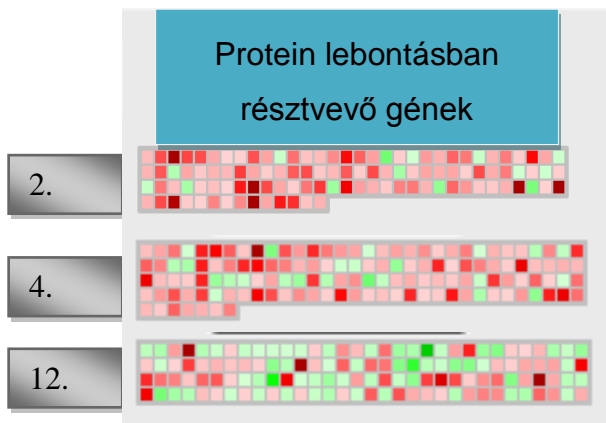
A géncsökkentett növényekben a BR-el kapcsolatos markerként a hyperszenzitív reakció gátlását, a növényben szaporodni képes kompatibilis kórokozó szaporodását, valamint a védekezési reakciók során felszaporodó hidrogén-peroxid mennyiségét mértük. A méréseket a kifehéredett levelek alatti első levélszintekből végeztük ahol még hatásos a kívánt gén géncsökkentése, de a fehéredés nem zavarja a kísérleteket. A géncsökkentett növényekkel kapott eredmények a cisztein proteáz és a fehérjeszintetizáló rendszer (riboszóma alegységek) védekezésben játszott szerepét mutatják (**12. ábra**).



12. ábra. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *hopQ* kompatibilis baktérium sejtszáma kontroll (PDS) és protein anyagcsereben résztvevő génekben csendesített *Nicotiana benthamiana* levelekben. A baktériumokat 10^5 sejt/ml koncentrációban injektáltuk a levelekbe, majd a 3. napon levélkorongokat vágunk ki, amelyből hígítási és tenyésztési módszerrel meghatároztuk a szövetben lévő baktériumok számát. A csillagok a PDS kontrolltól szignifikánsan eltérő ($P < 0,01$) mutáns növényeket jelölik. A hibavonalak a szórást mutatják. A kísérlet kétszer ismételtük meg hasonló eredménnyel.

Protein lebontásban résztvevő Arabidopsis gének BR-ben betöltött szerepének vizsgálata mutáns növények segítségével

A proteináz génekben mutáns növények kiválasztásához kétféle megközelítést használtunk. Egyrészt cisztein, és szerin típusú proteázok, illetve cisztein proteináz inhibitor kódoló géneket kerestünk *Arabidopsis*-ban. Azért éppen ezeket, mert a korábbi kísérleteinkben azt találtuk, hogy ezek a típusú proteáz gének aktiválódtak a legjobban a baktériumfertőzésre, illetve az proteáz inhibitorokkal végzett kísérletek is utaltak e típusú proteázok lehetséges szerepére a BR-ben. Az adatbázisból kikeresett géneknél az *Arabidopsis* a nyilvános adatbázisokban megnéztük, hogy válaszolnak-e baktériumfertőzésre vagy valamely BR-t indukáló baktérium alkotórészre (pl. flagellin, LPS). Ezek közül azokat választottuk ki, melyek aktivációja legalább kétszeres mértékben fokozódott vagy mérséklődött többféle kezelés hatására is (18 db). A másik megközelítés esetében nyilvános microarray adatbázisból olyan adatsorokat töltöttünk le, melyek a fertőzés után különböző időpontokban készült expressziós értékeket tartalmazta a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 törzs betegségét nem okozó *hrcC* baktérium fertőzése után. Az egyes időpontokhoz tartozó biológiai ismétlések értékeit átlagoltuk, majd a MAPMAN szoftver segítségével jelenítettük meg az egyes időpontokban a fehérjelebontásban résztvevő gének kifejeződését (13. ábra).

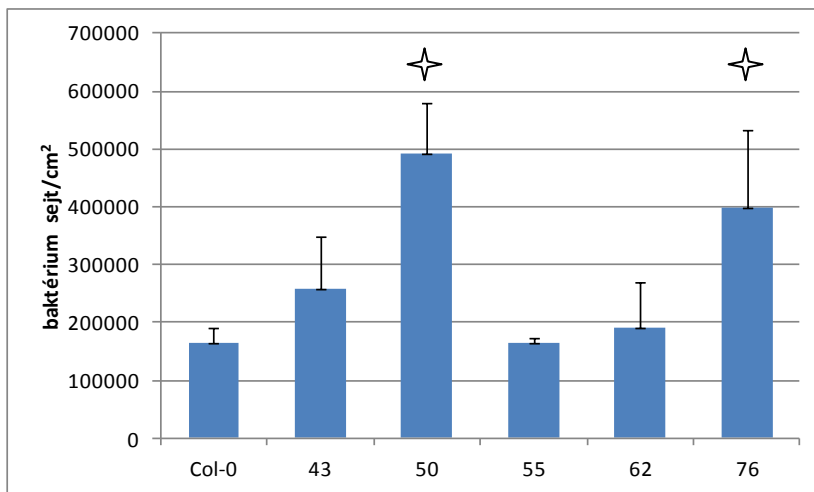


13. ábra. *Arabidopsis* protein lebontásban résztvevő gének átíródása *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrcC* betegségét nem okozó mutáns baktériumok infiltrálása után különböző időpontokban. Az adatokat nyilvános adatbázisból töltöttük le, majd MAPMAN programmal osztályoztuk és ábrázoltuk (részletek a szövegben). Mindegyik négyzet egy-egy gén kifejeződési szintjét jelöli a nem injektált kontrollhoz képest. A piros az aktivációt a zöld repressziót jelöli. A színek intenzitása a változás mértékét jelöli. Az itt megváltozott aktivitást mutató gének közül választottunk mutáns növényeket

Ezután a Nottinghami *Arabidopsis* Törzsgyűjteményből a megváltozott aktivitású proteináz gének T-DNS mutánsait kerestünk. Elsősorban olyanokat, amelyeknél a T-DNS beépülése az adott gén exonjába vagy a promóter régiójába történt, nagyobb eshetőséget adva a mutáció hatásának megjelenésére. Ebben az esetben is olyan mutánsokat választottunk a magbankból mely a mutációra homozigóta volt (60 db). Közel nyolcvan (78 db) magot rendeltünk majd ezeket elvetve és ebből a növényeket felnevelve baktériumfertőzésre teszteltük őket. A növények fenotípusosan nem mutattak jelentős eltérést a vad Col-0 növényekhez képest.

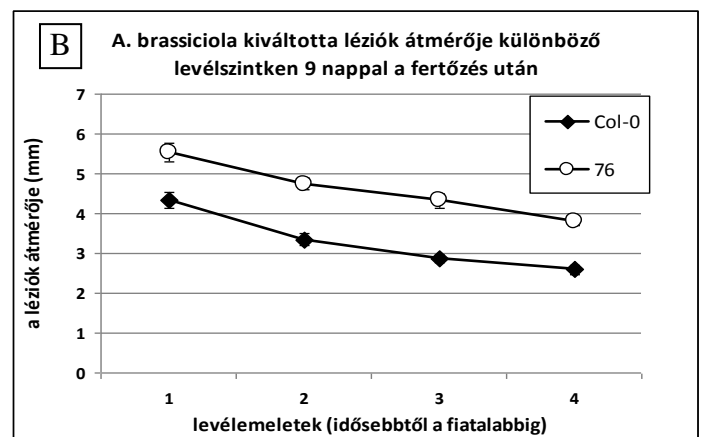
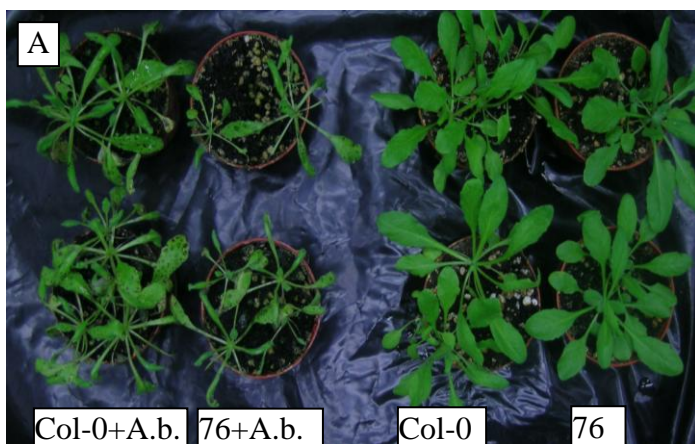
Először olyan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzsszel fertőztük a növényeket, amely egy lumineszkáló (ún. lux) gént hordoz. A lumineszcencia változásából következtetni lehet a baktériumszám változásának mértékére. Ez a módszer, mivel nem igényli a baktériumok izolálását a növényből lehetőséget teremt nagyszámú növény egyidejű tesztelésére. Ezeknek a vizsgálatoknak az alapján ki tudtunk választani néhány olyan mutáns növényt, amelyben a baktérium kiváltotta lumineszcencia az ismétlésekben nagyobb valószínűséggel mutatott magasabb vagy alacsonyabb értéket a kontroll növényekhez képest. Ezeket részletesebb baktériumszaporodási kísérleteknek vetettük alá. A 14. ábrán 50-es

számmal jelölt (karboxipeptidáz) és a 76-os (szubtiláz,) mutáns növényben szignifikáns baktériumszám különbséget tudunk kimutatni a vad típusú növényhez képest a fertőzést követő harmadik napon. E két proteáz gén tehát pozitív szerepet játszhat a védekezés kialakulásában.



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

A növénykórokozó baktériumon kívül más típusú kórokozóra történő növényi válasz megváltozását is megvizsgáltuk néhány kiválasztott mutáns növényekben. A **15. ábra** a 76-os szubtiláz mutáns eltérő növényi tüneti válaszát mutatja *Alternaria brassicicola*-val történt fertőzését követően. A szubtiláz mutáns növény tehát nemcsak a hemibiotróf *P. syringae* baktériummal, hanem a nekrotrof gomba fertőzésére is eltérő módon reagált, ami a gén védekezésben betöltött szerepét erősíti.



15. ábra. A) Tünetek *Alternaria brassicicola* –val (A.b.) fertőzött vad típusú (Col-0) és szubtiláz (76) mutáns növényeken. A szubtiláz mutáns erőteljesebb gomba kiváltott növényi sejtelhalást mutat 9 nappal a fertőzés után (a fertőzés 5×10^5 konidiummal történt). Kontroll növények fertőzés nélküliek.

B) *A. brassicicola* kiváltotta léziók átmérője különböző levélszinteken 9 nappal a fertőzés után (a fertőzés 5×10^5 konidiummal történt).

A gének rezisztenciában betöltött funkciójának pontosabb meghatározása a későbbi kutatások feladata lesz. A többi részletesebben nem vizsgált mutáns növény között még lehetnek a védekezést befolyásoló gének, melyek vizsgálata szintén további kutatást igényel.

További teendők és lehetséges kutatási irányok

A közeljövőben tervezzük még az eredmények eddig nem publikált részének közlésre történő előkészítését. A kapott eredménynek nagy része eddig még nem vizsgált új tudományos eredmény. Folytatni szeretnénk továbbá az eddig funkcionális módszerekkel (géncsendesítés, mutáns növények) azonosított, a BR kialakításában résztvevő növényi gének további jellemzését, funkciójának pontosabb meghatározását, illetve további védekezésben résztvevő gének azonosítását.

Megjelent publikációk:

László R Zsíros, Ágnes Szatmári, Erika Szabó, Péter G Ott, Zoltán Bozsó Plant protein degradation affects transcription of genes associated with bacterium-induced basal resistance Acta Biol Szegediensis 52: (1) 253-255. (2008)

Bozsó Z, Maunoury N , Szatmari A, Mergaert P, Péter G Ott, Zsíros LR , Szabó E, Kondorosi É, Klement Z Transcriptome analysis of bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. PLANT MOL BIOL 70: (6) 627-646. (2009)

Ghareeb H, Bozsó Z, Ott P.G., Repenning C , Stahl F, Wydra K: Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non accumulator tomato implicates priming effect reference, Physiological and Molecular Plant Pathology 75:83-89. (2011)

Erika Szabó, Ágnes Szatmári, É. Hunyadi-Gulyás, E. Besenyei, L.R. Zsíros, Z. Bozsó and P.G. Ott Changes in apoplast protein pattern suggest an early role of cell wall structure remodelling in flagellin-triggered basal immunity BIOLOGIA PLANTARUM 56 (3): 551-559 (2012)

Közlésre előkészített publikációk:

Ágnes Szatmári, Eszter Besenyei, Erika Szabó, László Róbert Zsíros, Ágnes Zvara, László G. Puskás, Péter G. Ott, Zoltán Bozsó. Isolation and characterization of genes associated to basal resistance of tobacco by suppression subtractive hybridization; microarray and real-time RT-PCR

Zoltán Bozsó, László Róbert Zsíros, Eszter Besenyei, Péter G. Ott, Ágnes Szatmári. Defense related gene expression in bacterial infected tobacco leaves and dependence of basal resistance-related gene expression on some signaling pathway