

ZÁRÓJELENTÉS:

A CSOPORTUNK ÁLTAL LEÍRT ÁLTALÁNOS NÖVÉNYI REZISZTENCIA PATOLÓGIAI, BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS FOLYAMATAINAK TOVÁBBI VIZSGÁLATA

OTKA AT049318

2005.02.01. - 2007.12.31

RÖVIDÍTÉSEK

2D ELFO: kétdimenziós elektroforézis, nem denaturáló körülmények közötti izoelektromos pont, majd ezt követően molekulaméret és/vagy harmadlagos szerkezet szerinti elválasztás poliakrilamid géleken

BR: Általános rezisztencia (*basal resistance, basal defence*)

EBR: korai általános rezisztencia (*early basal resistance*)

EBR-CHT: EBR-hez kapcsolható kitináz(ok). Natív elektroforézis-géleken két, együtt és egymáshoz közel megjelenő csíkként láthatók

HPLC: nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

IEF: izoelektromos fókuszálás

IEX: ioncserélő kromatográfia

IWF sejtközötti mosófolyadék: A növényi sejtfalból (apoplaszt) vízzel kioldható anyagokat, így pl. fehérjéket, cukrokat stb. tartalmazza.

MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption/ ionization - time of flight mass spectrometry*)

PCR: *polymerase chain reaction*

SDS-PAGE: Nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid gél elektroforézis.

BEVEZETÉS

A növényi általános rezisztencia (BR) több, mint negyven éve ismert jelenség, mégis, mostani nagy népszerűségét az állati természetes immunitással való párhuzamnak (*innate immunity*) köszönheti. Szerkezeti hasonlóságok fedezhetők fel az állatok idegen-felismerő sejtfelszíni receptorai ('Toll like receptors', TLR) és a növények rezisztencia fehérjéi között. Az állati TLR-okat aktiváló baktérium molekulák némelyike egyben a BR elicitora is.

Kevesebben tudják, hogy a BR vizsgálatának hagyományai több mint negyvenévyire, és nagyrészt intézetünk kutatóinak úttörő munkásságáig nyúlnak vissza (Lovrekovich and Farkas, 1965; Burgyán and Klement, 1979). Néhai Klement Zoltán és kutatócsoportjai következetesen folytatták e hagyományt a mai napig. Ezen alap kutatások fő támogatója az OTKA volt. Jelen pályázati munka a BR molekuláris mélységeibe enged betekintést, emellett azonban igyekeztünk a BR-t összefoglalóan áttekinteni és elhelyezni a növényi rezisztenciák rendszerében (Ott et al., 2006a; Ott et al., 2006b; Bozsó et al., 2007). Ennek során a BR-t így határoztuk meg: 'Az általános rezisztencia (BR) a növények tünetmentes, tünetcsökkentő, helyi védekezési válasza, melyet mikrobákra általánosan jellemző molekulák (MAMP) indukálnak. Ható molekulái (effektorai) a sejtfalban fejeződnek ki, virulens kórokozók és valószínűleg bármely felismert baktérium ellen.' (Ott and Bozsó, 2008). Eredményeinket röviden, az eredeti munkaterv pontjainak megfelelő bontásban tárgyaljuk.

1. PROTEOMIKA ALCSOPORT (OTT PÉTER G, PHD., BESENYEI ESZTER ÉS SZABÓ ERIKA, PHD HALLGATÓK ÉS KLEMENT ZOLTÁN, MHAS):

Ezt a pontot azért tartottuk fontosnak, hogy nagy mennyiségben előállíthassuk a korábban az EBR-rel kapcsolatba hozott kitinázt (EBR-CHT), valamint, hogy esetleg újakat is találjunk, melyek szintén közreműködhetnek az EBR mechanizmusában. Távlati cél a kitinázok szabályozott kifejeztetése.

1. 1 DOHÁNY EBR-KAPCSOLT KITINÁZAINAK KLÓNOZÁSA (SZABÓ ERIKA)

1.1.1 EBR-KAPCSOLT KITINÁZOKRA (EBR-CHT) SPECIFIKUS PCR INDÍTÓ OLIGONUKLEOTIDOK TERVEZÉSE, SZINTÉZISE

A korábban aminosav szekvencia szinten azonosított és részben klónozott kitináz gén teljes szekvenciájának meghatározásához az 1. évben hővel előlt *P. syringae* baktériummal dohány növényekben EBR-t indukáltuk, ahol kontrollként vízzel injektált illetve kezeletlen leveleket használtunk. A növényekből RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk. A gén klónozását *random amplification of cDNA ends* (5'RACE) módszerrel, erre a kitináz géne specifikus primer segítségével végeztük.

1. 1. 2 EBR-T MUTATÓ LEVELEKBŐL MRNS KIVONÁSA, ERRŐL CDNS ÍRÁSA, UTÓBBIBÓL SPECIFIKUS EBR-CHT SORRENDEK FELSZAPORÍTÁSA PCR SEGÍTSÉGÉVEL

Annak ellenére, hogy az 5' RACE módszer több változatát kipróbáltuk és genomi DNS-ből is próbálkoztunk amplifikációval a megfelelő kitináz izoenzim szekvenciáját még nem sikerült megkapni (más izoenzimét igen). A szekvencia adatbankban azonban találtunk egy frissen publikált, dohányból származó, teljes kitináz szekvenciát (azonosító DW000275), mely azonos, vagy nagyon hasonló az általunk korábban klónozott gendarabhoz.

A specifikus primerek azt még azonban lehetővé tették, hogy az EBR-CHT gén átírásának szabályozását nyomon kövessük. Azt találtuk, hogy a gén az EBR során az egyik legkorábban átíródó gén, már 1 órán belül mértünk jelentős indukált transzkripciót. Az EBR önmagában is egy gyors védekezési válasz. Az EBR-CHT kifejeződése az apoplasztban magában foglalja az érzékelés, jelátvitel, gén átírás, fehérjeszintézis, válogatás, szállítás és kiválasztás teljes vertikumát, mindezt a lehető legrövidebb idő alatt. Ez a mélység és

közvetlenség véleményünk szerint az ilyen korai fehérjék kulcsfontosságára utal a növényi immunitásban (Ott et al., 2006b). Emellett szól, hogy az EBR-CHT kifejeződés specifikus a baktérium-kiváltotta stresszre, szalicilsav-független, valamint jázmonsav és etilén sem váltja ki. (Ott et al., 2006b).

1. 1. 3 BR-KAPCSOLT KITINÁZ (EBR-CHT) BÁZISSORREND MEGHATÁROZÁSA

A fent említett teljes dohány kitináz cDNS szekvenciából (DW000275) kiindulva a 2. évben végül sikerült a saját cv. 'Samsun' növényeinkből klónozni a megfelelő cDNS-t.

EBR indukált dohánynövény apoplaszt fehérjéit natív poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd az EBR-CHT fehérjét a gélből izoláltuk. Az N-terminális utolsó 5 aminosavára kiterjedt szekvenálás eredménye: S N G G S, melynek alapján megállapítható, hogy megegyezik a nyilvános adatbázisban szereplő, IV osztályba sorolható dohány kitináz N terminális szekvenciájával. A Szatmári Ágnes által klónozott cDNS növényben, illetve *in vitro* transzlációs rendszerben kifejeztetve (ld. 1.1.4.) működőképes kitináz enzimet eredményezett az utolsó 4 N-terminális aminosav hiányában is. A fehérje nem tartalmazza a kitinkötő régiót, annak ellenére, hogy ennek az RNS szintű átíródása bizonyított. Feltételezhető, hogy posztranszlációs és/vagy mRNS szintű módosítás soránvész el ez a rész. Ez egyúttal magyarázza az 1.2.1. pontban a kitinkötő kromatográfiás oszloppal való próbálkozásunk eredményét is.

1.1.4 EBR-CHT GÉNEK KLÓNOZÁSA KIFEJEZTETŐ VEKTOROKBA, MEGFELELŐ MIKRÓBA GAZDÁKBAN

A baktériumos kifejeztető vektorokba való klónozás célja eredetileg a klónozott kitináz termeltetése és ellenőrzése volt, az eredetivel való összehasonlítás segítségével. Először azonban *in vitro* transzlációs rendszert próbáltunk ki élő baktérium helyett. Ezzel azt reméltük, hogy kiküszöbölhetjük a feltehetően baktériumgátló fehérje termeltetésének esetleges nehézségeit. (ld. még 1.2.3). Nyúl retikulocita lizátum rendszerben alátámasztottuk, hogy a klónozott EBR-CHT génszakasz valóban működőképes kitináz enzimet kódol. A szintetizált kitináz az EBR-CHT felső csíkjával (ld. még Rövidítések részt) megegyező méretű volt. Mivel csak az egyik (a nagyobb) fehérje csík jelent meg, feltehetően ebben a rendszerben nem ment végbe a fehérje posztranszlációs módosulása, mely a rövidebb izoenzimet eredményezhette volna. Az *in vitro* szintetizált kitináz lizozim aktivitását (ld. még 1.2.2) nem mérhettük a retikulociták saját, magas lizozim tartalma miatt.

1.2 DOHÁNY EBR-KAPCSOLT KITINÁZAINAK JELLEMZÉSE (OTT PÉTER G. ÉS SZABÓ ERIKA)

Alább először a natív, dohány enzimmel (enzimekkel) foglalkozunk, az 1.2.3 pontnál térünk a klónozott változatra.

Vizsgálatainkat 2D ELFO technikával EBR specifikus fehérjék, elsősorban további kitinázok keresésével kezdtük. Különböző módszerekkel elvégzett kitináz aktivitás tesztek alapján fehérjéket vágunk ki a gélekből, melyeket MALDI-MS analízisnek vetettük alá. A MALDI-MS készüléket a Szegedi Biológiai Központ Proteomikai Kutató Csoportja működteti. A hővel elölt baktériummal való EBR indukálás mellett baktérium-flagellinnel való indukálást is alkalmaztunk. A flagellin korábban igen hatékony EBR elicitornak

bizonyult (ld. még 1.3. pontot) és kis mérete, tisztasága miatt nem zavarhatja meg a nagy felbontású fehérje elválasztó gélek EBR-ről alkotott képét. Nem hihetjük azonban, hogy a flagellin képes minden, EBR-rel kapcsolatos folyamat előidézésére.


Az 1. évben két, EBR során megnövekedett termelődést mutató kitináz ill. kitinkötő aktivitással rendelkező fehérjefoltot azonosítottunk.

Identitásukra a 2. évben derült fény. A kitináz ill. kitinkötő aktivitással rendelkező - fehérjefoltokat az MS vizsgálat anionos peroxidáznak, illetve egy glukán endo-1,3-beta-D-glükózidáznak tulajdonította. A peroxidáz és glükózidáz kitinnel kapcsolatos tulajdonságai meglepőek és további megerősítő vizsgálatokra szorulnak.

A talált 'valódi' kitinázokat vettük górcső alá. Ezek közül 3, az EBR során indukálódó, míg másik 3 kitináz a dohányban folyamatosan termelődő enzim. A kitináz enzimek Nod-faktor szubsztrát bontó képességét vizsgáltuk. A Nod faktorok acilált kito-oligoszacharidok, melyek szignál molekulaként működnek a nitrogénkötő *Rhizobium* baktériumok és a pillangósvirágú növények szimbiotikus kapcsolatában. A kitináz enzimek az osztályukra jellemző specifikus helyen képesek hasítani, inaktíválni ezeket a molekulákat.

Kísérleteinkben Nod tetra- és pentamer molekulák bontását vizsgáltuk, a hasítási termékeket, dimer, illetve trimer képződést fordított fázisú HPLC készülékkel követtük nyomon.

Megállapítottuk, hogy az indukálódó kitinázok (EBR-CHT és egy újabb, szintén BR-specifikus fehérje) csak a pentamer bontására képesek. Ez alapján mindnyájan a 19 glikozil-hidroláz csoportba tartoznak, ezen belül pedig a IV osztályú kitinázok közé sorolhatók. A konstitutív kitinázok közül kettő szintén a 19 glikozil-hidroláz családba, míg egy a 18 glikozil-hidroláz családba tartozik (1.Ábra).

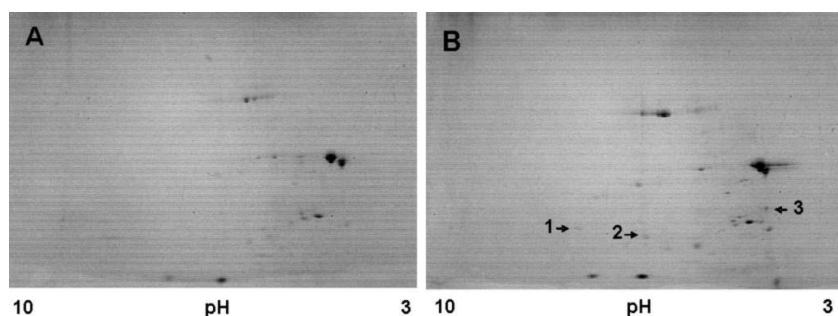
gélből izolált kitináz csíkok	tetramer emésztés	pentamer emésztés	Nod faktor emésztési mintázat alapján való besorolás	Kitináz aktivitás gél
1/1	igen	igen	18.glikozil hidroláz család ClassIII kitináz	
1/2	nem	igen	19.glikozil hidroláz család	
1/3 (89)	nem	igen	19.glikozil hidroláz család	
3 (128)	nem	igen	19.glikozil hidroláz család	
4 (215)	nem	igen	19.glikozil hidroláz család	
5 (250)	nem	igen	19.glikozil hidroláz család ClassIV kitináz	

1. Ábra. 6 kitinázt izoláltunk a gélből a kitináz aktivitás teszt alapján. 3 konstitutív (1/1, 1/2, 1/3), 3 indukált (3, 4, 5) volt. A 4- és 5-ös csík az EBR-CHT.

Az utóbbi valószínűleg III. kitináz osztályba tartozik, mert egyaránt képes a Nod faktor tetramerből dimert, és a Nod pentamerből trimert hasítani. A Nod faktor bontás intenzitása, időbeni lefutása jól korrelált a kitináz teszt eredményeivel.

Az vízoldható extracelluláris BR proteomról a következőket mondhatjuk el általánosságban: A 2D ELFO technika segítségével mintegy 130 fehérje volt elkülöníthető összesen a kontroll (105 fehérje) és a flagellin-kezelt (79 fehérje) mintákból, mintegy 5

órával a fertőzés után. 2 óra után még kevés az eltérés, de az EBR-CHT már megjelenik (2. Ábra). A 130-nak kb. 15%-a csak a flagellines, 21%-a csak a kontrollban található. Meglepetésünkre tehát inkább represszió történt, mint indukció. Ez a korábbi, egydimenziós gélek képeiből nem látszott, mivel mennyiségileg inkább indukció jellemzi az EBR-t, de ez nyilván csak néhány extracelluláris fehérjére jellemző. A flagellines 2D gélekből kimutatott BR-re jellemző fehérjék: egy glutation S-transzferáz, PR-5d, PR-1b kórfehérjék, egy szuperoxid-dizmutáz, beta-1,3-glükánáz és germin-szerű fehérje (Szabó et al., 2006).



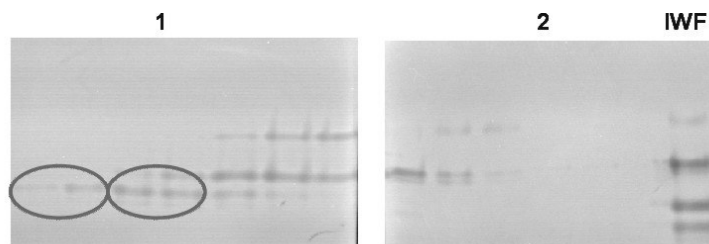
2. Ábra. 2D ELDFO gélkép vízzel (A) és flagellinnel (B) injektált növényekből, 2 óra után A MALDI-MS elemzésre küldött fehérjék nyíllal vannak jelölve. 1: Kórfehérje 2: feltételezett glutation S-transzferáz 3: EBR-CHT

1.2.1 EBR-CHT TISZTÍTÁSA A VEKTOROKBÓL, ÉS AZ EREDETI ENZIMEK IZOLÁLÁSA A GAZDANÖVÉNYBŐL

A natív EBR-CHT nem kötődött meg a kitin-affinitás kromatográfiai oszlopon, így nem lehetett izolálni a fehérjében egyébként is rendkívül szegény (csak kb. 30 ug/ml) sejtközötti mosófolyadékából.

Megoldást kerestünk az IWF fehérjék hatékony és kíméletes besűrítésére. Az EBR-CHT tekintetében jól bevált az ammónium szulfátos kicsapás, valamint a háromfázisú szétválasztás melyben Szamos Jenő, a Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet munkatársa volt segítségünkre. Mivel távlatilag több IWF fehérjével is szeretnénk foglalkozni, a kíméletesebb eljárást, az ammónium szulfátos aggregációt választottuk.

Első kipróbált preparatív elválasztási módszerként az IEF technikához fordultunk, mely folyadékban, natív körülmények között frakcionálja és egyben sűríti is a mintákat. A kitinázokat tartalmazó frakció még így is sok fehérjét tartalmazott, ami azt jelzi, hogy a sejtfalba kiválasztott vízdoldható fehérjék töltése nagyon hasonló. Ez a részleges elválasztás is megengedett azonban bizonyos megfigyeléseket (ld. 1.2.2). A nagyobb felbontás érdekében először a fordított fázisú HPLC bevonására gondoltunk, mely egy más elven alapuló elválasztási dimenzióval kecsegtetett. Az említett HPLC rendszerű elválasztás azonban olyan szerves oldószert (acetonitril) használ, mely veszélyeztette az EBR-CHT stabilitását és aktivitását. Az izoelektromos fókuszálás szintén lehet denaturáló hatású, viszont az EBR-CHT enzimet látszólag nem bántotta. Újabb elválasztási dimenziók után keresve kíméletesebb, kisnyomású eljárások felé fordultunk, mint a HIC és IEX. anion cserélő IEX segítségével jelentős tisztítást lehetett végezni, de a kitináz-aktivitású fehérjéket egymástól nem különítette el. A HIC-hez először meghatároztuk az optimális kezdő ammónium szulfát koncentrációt, amit 35 telítettségi %-ban határoztunk meg. A fenil szefaróz HIC oszlopon sikerült elválasztani az EBR-CHT enzimet egyéb kitinázoktól, sőt, a két EBR-CHT fehérjecsíkot is 3. Ábra.



3 Ábra. 12 órás hővel előlt *P. phaseolicola* baktériummal indukált dohány apoplaszt fehérjék frakcionálása HIC kromatográfiával. Az A frakciókat natív PAGE gélen elválasztottuk, és kitináz aktivitás tesztet végeztünk. (1 és 2 gélkép példa az aktív frakciókra.) A 2. gélképen a teljes kiindulási IWF-t vittük fel kontrollként. Bekarikázva az EBR-CHT csíkjai láthatók.

Ez nagyon kedvező eredmény, mivel a natív EBR-CHT fehérjét eddig mindig két elektroforetikus csíkban láttuk és a MALDI-TOF sem igazán tudott kettejük között különbséget tenni. A HIC hátránya egyelőre, hogy nagymértékben tartja vissza az EBR-CHT enzimet, vagyis nagyok (95%) a veszteségek. Ugyanakkor, még IEF-sal összekapcsolva is maradt szennyező fehérje a mintáinkban. A veszteség reményeink szerint csökkenthető eltérő oszlopméretezéssel és minőséggel, és itt jegyezzük meg, hogy az EBR-CHT, mint sejtfalba szánt fehérje, feltehetően jellegzetes kölcsönhatásokba bocsátkozik poliszaharid mátrixokkal, mint maga a sejtfal és egyes kromatográfiai oszlopok. Ez a párhuzam sok értékes következtetésre ad majd lehetőséget.

1.2.2 A KLÓNOZOTT ÉS AZ EREDETI ENZIMEK SZUBSZTRÁT-SPECIFITÁSÁNAK, NÉHÁNY KINETIKAI JELLEMZŐJÉNEK MEGHATÁROZÁSA

Számos kitináz képes bontani a peptidoglikánt (PGN, ld. 1.3. pontot), vagyis lizozim aktivitást is mutat. Esetünkben ez azért érdekes, mert jelezhetné az EBR-CHT közvetlen baktérium gátló szerepét. Amikor dohány IWF mintákat teszteltünk PGN-t tartalmazó gélekre cseppentve, nem sikerült lítikus zónát megfigyelni. IEF-sal elválasztva az IWF-et, az egyik IEF frakció (pH 3.8-4.4) baktérium peptidoglikán-bontó aktivitással bírt, ami kizárásos alapon az ugyancsak itt található EBR-CHT enzimeknek volt tulajdonítható, ugyanis több más kitináz-lizozim-aktivitású fehérjét sikerült irodalmi adatok alapján azonosítani Varga, 2006. A HIC segítségével különválasztott (ld. 1.2.1) kitináz-aktív frakciókat IEF-sal tovább tisztítottuk és az EBR-CHT-t tartalmazó lizozim aktivitással is bírt. Megállapíthatjuk, hogy bár a tisztítás foka még nem teljes, nagy valószínűséggel állítható, hogy a talált indukált lizozim aktivitás az EBR-CHT-é.

Az EBR-CHT jellemzését tovább folytattuk olyan fontos baktérium-eredetű jelmolekulákkal szemben, mint a Nod faktorok, mely lehetővé tette az EBR-CHT osztályozását (bővebben ld. 1.2).

1.2.3 A KLÓNOZOTT ENZIMEK GÉNJEINEK BEJUTTATÁSA MODELL NÖVÉNYEKBE

A kitináz védekezésben betöltött szerepének vizsgálatához a hisztidin farokrészsel (His) jelöltük és a klónozott gént növényi vírus vektorba (PVX) építettük be. Ezzel a módszerrel a gén növénybeli túltermelését céloztuk meg. A vírus vektorral *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztünk. A kitináz gén sikeresen átíródott a növényben. Sőt, mind a kitináz aktivitás teszt, mind a His-t jelző immun kimutatás (*Western blot*) pozitív eredményű volt. A transzfehérje mérete a nagyobb EBR-CHT méretének felelt meg, akárcsak az *in vitro* (ld. 1.1.4) kifejeztetésnél. A növény egyes szerveit külön vizsgálva azt találtuk, hogy ezzel a módszerrel a kitináz gyakorlatilag a növény minden szervében azonos mennyiségben termelődik. A *N. benthamiana*, bár megfelelően kijuttatta a sejtfalba, mégis lényegesen

kisebb mennyiségben termelte a transzfehérjét, mint az 'anyanövény', a *N. tabacum* a natív fehérjét. A növény méretéből fakadóan az így kinyerhető kitináz enzim mennyisége - mikrobiológiai hatásvizsgálatra - nem kielégítő. Érdekesség, hogy a transzfehérje kevésbé tűnik stabilnak, mint az eredeti, natív enzim. Közben nagyobb kapacitású kifejeztető vektorok után kellett nézni (egy ilyen már birtokunkban van), nagyobb hangsúlyt kapott a natív fehérje tisztítása, ld. 1.2.1. pontot.

1.2.4 A KAPOTT TRANZSGENIKUS NÖVÉNYEK FELNEVELÉSE, TRANSZFORMÁCIÓ IGAZOLÁSA

A vírusvektorok alkalmazása ezt a pontot kiküszöbölte.

1.2.5 EREDMÉNYESSÉG ESETÉN PATOLÓGIAI VIZSGÁLATOK A KAPOTT TRANZSGENIKUS NÖVÉNYEKEL, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL AZ EBR-BEN ÉS LBR-BEN KIMUTATHATÓ SZEREPÜKRE

A vírus révén való kifejeztetés időt és fáradságot takarított meg, de több problémát is felvetett. Az idegen gén kifejeződése, bár megtörtént, a vírus fertőzési sajátosságainak megfelelően nem homogén módon, hanem mozaikos foltokban és csak időlegesen. A vírusfertőzés pedig a keresztrezisztencia ill. -érzékenység révén óhatatlanul elválogtatja a növények rezisztencia esélyeit a baktériumokkal szemben. Ez a növényfertőzéses kísérleteket nem csak technikailag nehezítette meg, de az eredményeket is nehéz volt interpretálni. Megoldást jelenthet stabil transzformánsok létrehozása, ill. a megtermelt fehérje kipróbálása *in vitro* tesztekben és irányított transzgen rendszerekben.

A növényből ill. akár más forrásból izolált bioaktív anyagok baktérium gátló hatásának tesztelésére intézetben belüli együttműködés keretében fejlesztettünk ki egy elválasztás - bioautográfiás rendszert, az ún. BioArena-t, mely alkalmas az (vékonyrétegen) elválasztott anyagok hosszú távú (több napos) megfigyelésére és adalékanyagok rendszerbe juttatása révén az antibakteriális hatásmechanizmus feltárására is (Tyihak et al., 2007b; Moricz et al., 2007). Az EBR-CHT esetében a tesztet még nem próbáltuk ki, mivel vékonyrétegen még nem tudjuk a kitinázt követni, és mert elsősorban ennek lizozim aktivitását igyekeztünk igazolni, ld. 1.2.2. pontot. A BioArena azonban újat tudott mondani olyan, jól ismert antibakteriális tesztvegyületek hatásának mechanizmusáról, mint az aflatoxinok vagy növényi alkaloidok, nevezetesen, a metiláció és ezzel a formaldehid közvetítő szerepéről, mely a végzetes molekuláris sérülésekhez vezet (Tyihak et al., 2007a; Sárközi et al., 2006). Ezek az módszerek és eredmények új távlatokat nyithatnak a biológiailag aktív anyagok keresésében és hatásaik mélyelemzésében (Tyihak et al., 2008).

1.3 LEHETSÉGES MIKRÓBA EREDETŰ ELICITOROK EBR-T (ÉS NÉHÁNY MOLEKULÁRIS EBR MARKERT) INDUKÁLÓ HATÁSÁNAK JELLEMZÉSE (OTT PÉTER G., SZABÓ ÉRIKA, VARGA GABRIELLA)

A növényi felismerő mechanizmus, feltehetően sok jellemző idegen molekula komplex felismerésén alapul, akár csak pl. az emlősökben. Korábbi kísérleteinkben (ld. 38302, 40835 sz. OTKA jelentések) a baktérium eredetű lipopoliszahariddal (LPS), valamint a flagellin ostorfehérje különböző méretű peptidjeivel, EBR, valamint EBR- fehérje marker indukálását vizsgáltuk. Számos egyéb baktérium komponens is ismert azonban, amely állatokban általános védekezést (*innate immunity*), növényekben valamilyen védekezésre utaló reakciót

válthat ki. Fontos tudnunk minél többről, hogy ezek kiváltják-e az EBR-t. Az alább felsorolt és tárgyalandó molekulákat vásároltuk (PGN) vagy Thomas Boller svájci kutató csoportjától kaptuk, ezúton is köszönjük (CSP, EF-Tu).

Az egyik legismertebb, és legtöbbet vizsgált elicitor állati rendszerekben a peptidoglükán (PGN), amely a baktériumok sejtfalának poliszaharid alkotóeleme, és szerkezete a kitinéhez hasonló. A PGN növénybeni elicitor aktivitásával mindösszesen két tudományos dolgozat (Wacek and Sequeira, 1973; Felix and Boller, 2003) számolt be, egészen 2007-ig. Saját eredményeink nagyon hasonlítottak a 2003-as dolgozatban leírtakhoz, annak ellenére, hogy teljesen más növényi rendszerben vizsgáltuk. A tisztán megvásárolt PGN-t több koncentrációban is injektáltuk dohányba, de mind a HR-gátlás, mind a fehérje marker vizsgálatunkkal csak nagyon gyenge elicitor aktivitást mutatott Varga, 2006. A PGN-t tojásból származó lizozim enzimmel emésztve is ugyanezt az eredményt kaptuk. Időközben svájci kutatók kimutatták, hogy *Staphylococcus aureus*-ból maguk által készített peptidoglükán képes számos ismert védekezési reakció kiváltására lúdfüben Gust et al., 2007. Ez felveti a peptidoglükán minőségének (eredetének, előkészítésének) fontosságát, mint legfontosabb tanulságot. Ugyanakkor rávilágít annak a kutatási iránynak a helyességére, ami az indukált lizozim aktivitást határozná meg a dohány sejtfalban (ld. 1.2.2).

Lehetőségünk volt a baktérium eredetű ún. hideg-sokk fehérje peptidjének hatását (*Cold Shock Protein*) is megvizsgálni. A peptid növénybe injektálását követő 6, 12, 24 óra után vizsgáltuk az EBR működését. A korai időpontokban csak gyenge EBR-t tudtunk kimutatni, viszont 24 óra elteltével az flg22-től gyengébb, de a PGN által indukáltnál erősebb EBR-t kaptunk Varga, 2006.

Egy még újabb jellemzett baktérium eredetű általános elicitor, megtalálói véleménye szerint Kunze et al., 2004 csak keresztesvirágú növényekben hatékony, a *Solanaceae* családban nem. Ennek oka az elicitor receptorának hiánya lehet. Ennek ellenére mi azt találtuk, hogy részleges EBR-t és EBR-CHT aktivitást is indukált dohányban Varga, 2006. Maga az elicitor, az ún. elongációs faktor Tu (EF-Tu), mely egy nagyon konzervált, sejten belül nagy mennyiségben jelen levő, translációhoz szükséges fehérje, tehát 'ideális' baktériumjelző molekula lehet a növények számára. Ez az eredmény azért is fontos, mert jelzi, hogy bizonyos rezisztenciák, mint az általunk vizsgált EBR, híján lehetnek olyan részfolyamatoknak, melyeket az elicitor tulajdonságú molekulák keresésére szokás indikátorként használni. Ez meglepetés, hiszen az EBR egy igen komplex folyamat, amit saját genomikai és proteomikai vizsgálataink (ld. e jelentés megfelelő részeit) is jelzik.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált elicitorok eltérő mértékben, de aktiválták az EBR-t. Az eddig tanulmányozottak közül a flagellin volt a leghatékonyabb, az LPS a leggyengébb elicitor.

E vizsgálatok 'melléktermékeként' kiderült, hogy az EBR olyan baktérium-növény kölcsönhatást is akadályoz, mint a tumor indukció a golyvabaktérium *Agrobacterium tumefaciens* által (Varga et al., 2006). Tekintve a golyvásodás nagy gazdasági jelentőségét ezt a vizsgálati vonalat tovább folytatjuk.

1.4 AZ ÁLTALÁNOS REZISZTENCIÁHOZ KAPCSOLHATÓ MINŐSÉGI FEHÉRJE MARKER KIMUTATÁSA A PAPRIKA SEJTKÖZÖTTI MOSÓFOLYADÉKÁBAN (BESENYEI ESZTER)

A paprika levelek IWF-ének SDS-PAGE mintázatában két, a BR működésével párhuzamba állítható fehérje csíkot azonosítottunk. A csíkokat MALDI-TOF és LC MS/MS tömegspektrometriai módszerekkel elemeztük, a Szegedi Biológiai Központ Tömegspektrometriai Laboratóriumának munkatársaival. Az ezüst festéssel előhívott, kb. 32

kDa nagyságú molekula (Ca POX) két paprika peroxidáz fehérjével mutat hasonlóságot (GenBank AF442386.1, AJ810540.1). A 32 kDa nagyságú fehérje peroxidáz aktivitását SDS-PAGE során is igazoltuk. A kb. 22-26 kDa nagyságú, kitináz aktívitású csíkból (Ca Chis) a következő kitináz izoenzimekre illeszthető peptideket kaptuk: TC 3587 (www.tigr.org), mely a Q05540 II. osztályú extracelluláris paradicsom endokitináz homológ szekvenciája, és a TC 4206, mely Ca Chi2 II. osztályú bázikus kitináz. A Ca POX és Ca Chis BR markerek 30 °C-on tartott paprika növények IWF-éből kimutatott apoplaszt eredetű fehérjék. Ezek a markerek 5 °C-on az indukáló kezelés után nem jelennek meg az IWF-ben, alátámasztva ezzel korábbi eredményünket, mely szerint paprikában 5 °C -on a BR hatása nem mutatkozik.

2D ELFO módszerrel összességében 21 indukálódó fehérjét jelölő folt megjelenését követtük figyelemmel. Mind savas, mind bázikus tulajdonságú, specifikus BR-markereket találtunk.

1.4.1 A KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA A KORAI (EBR) ÉS KÉSŐI (LBR) ÁLTALÁNOS REZISZTENCIÁRA ÉS AZ EZZEL KAPCSOLHATBA HOZHATÓ NÖVÉNYI FEHÉRJÉK MEGJELENÉSÉRE

1.4.1.1 A HŐMÉRSÉKLET (5 ÉS 30 °C) HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A CaPOX és CaChi_s BR markerek 5 °C -on az indukáló kezelés után nem jelentek meg az IWF-ben, alátámasztva ezzel korábbi eredményünket, mely szerint paprikában 5 °C -on a BR hatása nem mutatkozik (Besenyei et al., 2005). A BR hiánya ezen az alacsony hőmérsékleten nagyon komoly gazdasági károkat is okozhat, az egyébként nem kórokozó, rizoszférában nagy mennyiségben jelenlevő ún. opportunistáknak inváziója miatt.

1.4.1.2 A FÉNYHIÁNYOS KÖRNYEZET HATÁSA

A IWF-ből azonosítható markerek megjelenését a BR működése során a fényviszonyok is módosítják. A BR aktiváló kezelések (*Pseudomonas fluorescens*, vagy hővel-elölt kórokozó) után 16 órával a Ca POX és Ca Chis BR markerek mind a sötétben tartott, mind a folyamatosan megvilágított inkubált növényekből nyert IWF-ben megjelentek. Az állandó megvilágítás a későbbi 48 és 72 órás mintákban is fenntartotta a markerek jelenlétét, és relatív mennyiségük is nőtt. A későbbi időpontokban a sötétben tartott növényekben viszont a Ca POX megjelenése csekély, a Ca Chis pedig a kimutathatósági határ alatt volt. Ezzel párhuzamosan ilyenkor a BR HR-gátló képessége sem működött. Ez utóbbi a munka végrehajtását az eredetileg tervezettnél előbbre hoztuk melyet az eredeti munkatervben 3.1.3.1 1. -el jelzett pont helyet végeztünk el.

1.4.1.2.1 AZ ELTÉRŐ NITROGÉN ADAGOLÁS KIDOLGOZÁSA PAPIKA NÖVÉNYEKRE

Vizsgálataink célja annak megállapítása, hogy a kedvező, vagy kedvezőtlen nitrogén-ellátottság mennyiben befolyásolja a BR kialakulását, és az ehhez köthető fehérjék megjelenését. Végül dohánynövényekkel dolgoztunk, mivel ezekkel előrehaladottabb ismereteink voltak a BR markereket illetően. A dohány növényeket perlites vízkultúrában neveltük a pontosabb tápanyag adagolás érdekében. Az EBR-t hővel elölt baktériummal indukáltuk, fehérjemintázatot 1D PAGE rendszerben követtük.

1.4.1.2.2 AZ ELTÉRŐ MINŐSÉGŰ (KNO₃ VAGY NH₄NO₃) ÉS MENNYISÉGŰ NITROGÉN FORRÁS HATÁSA

Az EBR-CHT markerek megjelenésében, az EBR működésében és az apoplaszt fehérjék összetételében nem sikerült különbséget kimutatnunk a normál nitrogén ellátottságú és nitrogénhiányos körülmények között nevelt növények között. Az EBR tehát nagymértékben független a nitrogén ellátottságtól, zavartalansága ilyen körülmények között is biztosított.

2 BAKTÉRIUMOK KÓROKOZÓKÉPESSÉGE (CZELLENG ARNOLD, BESENYEI ESZTER, PHD HALLGATÓK ÉS KLEMENT ZOLTÁN, MHAS):

2.1 GYENGÍTETT VIRULENCIÁJÚ (*GACA* MUTÁNS) *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TABACI* BAKTÉRIUM NÖVÉNYI KÖZEGBEN AKTIVÁLÓDÓ GÉNJEINEK MEGHATÁROZÁSA

A 'házilag' kifejlesztett IVET (*in vivo expression technology*) plazmid segítségével a *Pseudomonas viridiflava* patogén baktériumban a fertőzés után aktiválódó gének közül sikerült többet meghatározni, melyek közül pl. a *pel* pektinsav bontó enzim látványos lágyrohadási tünetekért felelős. Újonnan megismert növényben aktiválódó gén az *mviN*, melyről kiderült, hogy a baktérium virulenciája mellett annak mozgását is befolyásolja, s feltehetően a két tulajdonság közt szoros összefüggés áll fenn (Czelleng et al., 2006).

2.1.1 A *GACA* (GLOBAL ACTIVATOR) GÉN IZOLÁLÁSA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TABACI* BAKTÉRIUMBÓL PCR SEGÍTSÉGÉVEL. AZ IZOLÁLT GÉN DELÉCIÓS MUTÁNSÁNAK KÉSZÍTÉSE. A *P. SYRINGAE* PV. *TABACI* KNOCK-OUT MUTÁNSÁNAK ELKÉSZÍTÉSE

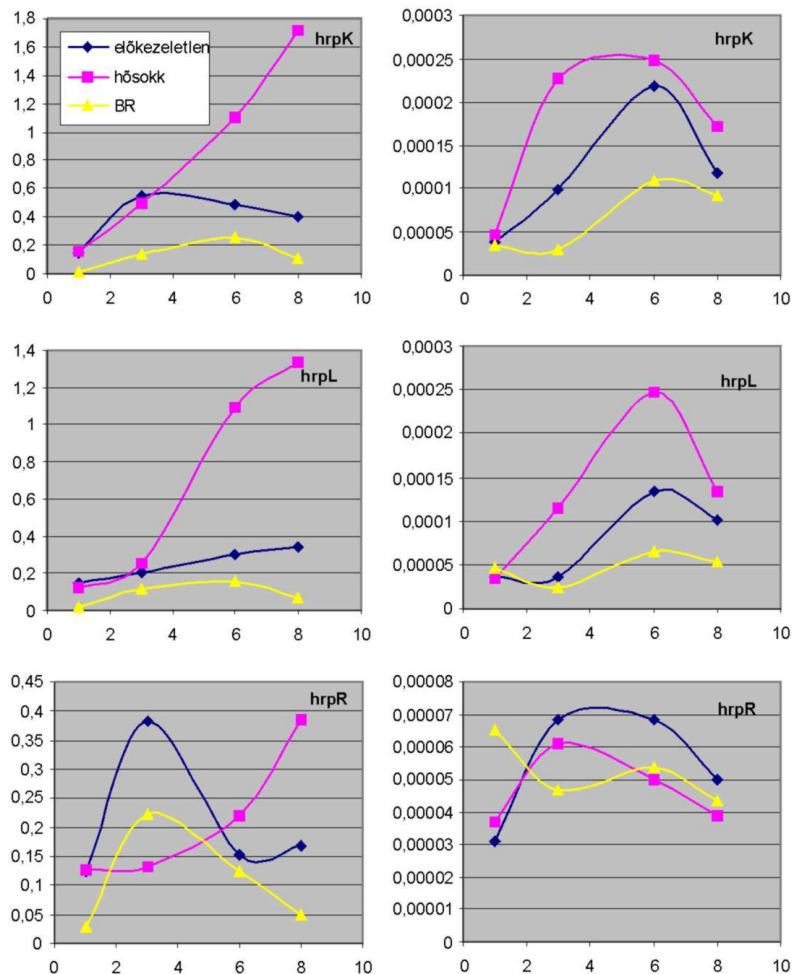
Pseudomonas syringae pv. *tabaci* tisztított genom DNS mintáról a Repfw2 (5'-ATTTCGTTATGTCCGTTGCG) és Reprv2 (5'-GCGAGAAAGGCACTTGGA) primer párral felszorzozott 710 nt méretű *gacA* szekvencia részletet klónoztuk. Klónozáshoz a pBluescriptKS kanamycin rezisztenciát kódoló, *aphA3* génnel egészített származékát használtuk. A plazmid SmaI helyébe ligáltuk a T4 polimerázzal tompa végűvé alakított részleges *gacA* fragmenst, majd az utóbbiba hasító SfiI endonukleázzal linearizáltuk a konstrukciót. Bal31 enzimmal deléciót készítettünk a klónozott *gacA* fragmens belsejébe. Ligálás után elektroporációval juttattuk *P. syringae* pv. *tabaci* baktériumokba a deléciós *gacA* származékot hordozó plazmidot. Kanamycin rezisztens telepeket szelektáltunk ki, amelyek a teljes plazmid szekvenciát egyszeres crossing over-rel a kromoszómába homológ rekombináció révén integrálódott formában tartalmazták. Ezek fitness-e azonban lényegesen eltért a vad típusú törzsetől. Gyenge növekedési erélyük LB és KB táptalajokon is megnyilvánult. Replica plating technikával nem voltunk képesek szelektálni kanamycin érzékeny, kétszeres crossing over mutánst. Az IVET génkönyvtárt így a vad típusú baktérium Sau3AI-el hasított és részlegesen feltöltött genomi DNS-éből készítettük, az Eco81I-vel hasított és részlegesen feltöltött végű pIviGKIII plazmid segítségével.

2.1.2 A MUTÁNS BAKTÉRIUMTÖRZS NÖVÉNYKÓRTANI LEÍRÁSA

A *gacA* mutánsok gyenge növekedését gazdag táptalajokon nem jóslhattuk meg előre, bár már ismert volt a gén fontossága a fitnesshez különböző környezetekben (pl. Heeb and Haas, 2001). Azt viszont számításba kellett volna venni, hogy a *GacA* számos alapvető patogenitási és virulencia faktor vezérlésében játszik szerepet, mint pl. Hrp és más, növényi sejtbe kiválasztott virulencia fehérjék Chatterjee et al., 2002, Chatterjee et al., 2003. Ennyire legyengített baktériumok sem védekezni, sem támadni nem tudnak a növényben, jelentősen eltorzítva azt a képet, amit az intakt kórokozóban mérhetnénk.

2.2 A BR HATÁSA A BAKTÉRIUMOK PATOGENITÁS GÉNAKTIVITÁSÁRA

E téma mellett a 2.1 pont folytatása helyett döntöttünk, a 2.1.2 pontban leírtak miatt, valamint azért, mert ez a kérdés még nincs kellően tisztázva. A Hrp (hiperszenzitív reakció - HR - és patogenitás) fehérjék egy kiválasztó rendszert képeznek, mely a virulenciához elengedhetetlen faktorokat, ún. effektor fehérjéket juttat ki a baktériumsejtből a növényi sejtbe. Ismert, hogy ezek a gének növényben aktiválódnak. A BR feltételezhetően gátolja ezen gének kifejeződését, de ez még nem bizonyított adekvát, korszerű módszerekkel. *hrp* mutánsok és riporter gének segítségével csoportunk korábban kimutatott ilyen gátló hatást (Bozsó et al., 1999; Klement et al., 2003). Korábban azt is találtuk, hogy frissen hőkezelt (51 °C, 15 másodperc) növényekbe injektált baktériumok *hrp* géntermékei túltermelődnek, ami valószínűleg a miatt van, hogy a sokkolt növény nem képes reagálni a baktériumok jelenlétére (Bozsó et al., 1999). Ezek az eredmények közvetett bizonyítékokon alapulnak, támadhatók. Ezért most dohányban mértük a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* egyes *hrp* génjeinek működését, átíródását, valós idejű PCR segítségével. Ez a baktérium HR-t okoz ebben a növényben, mintegy 8 óra elteltével, amihez tehát szükséges *hrp* génjeinek kifejeződése. Jelen kísérletsorozatban háromféle növényi környezetet hasonlítottunk össze, ahova a baktériumokat injektáltuk: hőkezelt levél; BR levél (BR elicitorral előkezelt); előkezeletlen levél. Eredményeink elvárásainkat igazolták: A BR az előkezeletlen levélhez képest gátolta, a hősokkolt levél serkentette a baktériumok patogenitás génjeinek kifejeződését, következésképpen, betegítő képességét 4. Ábra.



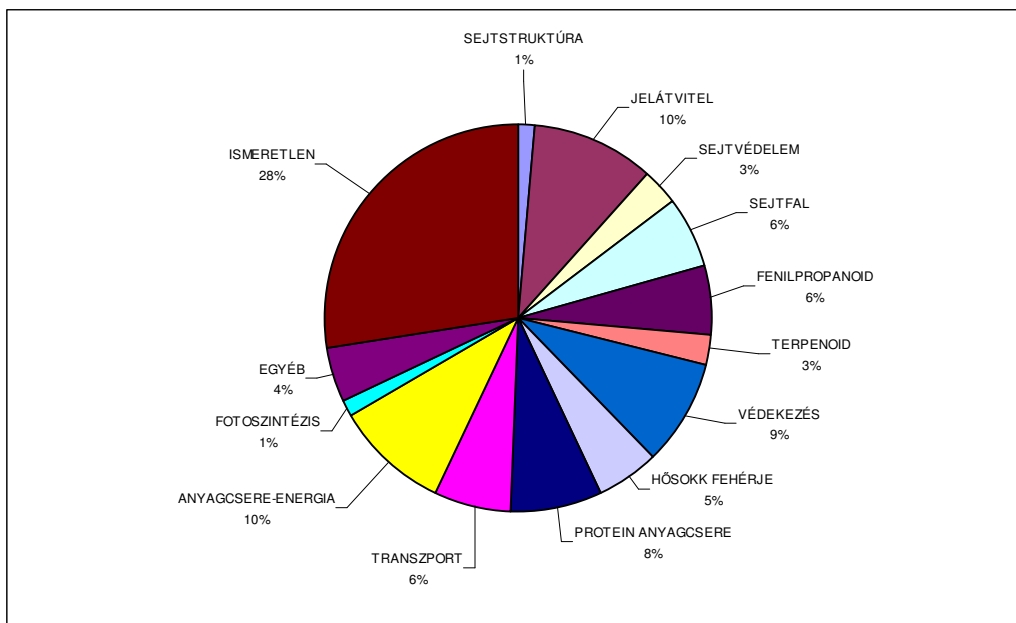
4. Ábra: BR hatása a baktérium *hrp* génaktivításra. A bal oldali 3 diagram a növényi aktin, a jobb oldali 3 diagram a baktériumok16 S riboszomális génjéhez képest, annak arányában mutatja a kifejeződést (függőleges tengely), a baktériumok dohánylevélbe injektálása utáni idősorban (vízszintes tengely, órában).

3 GENOMIKA (BOZSÓ ZOLTÁN PHD, SZATMÁRI ÁGNES ÉS BESENYEI ESZTER, PHD HALLGATÓK ÉS KLEMENT ZOLTÁN, MHAS):

3.1 TRANSZKRIPCIÓS VÁLTOZÁSOK AZ ÁLTALÁNOS REZISZTENCIA KIALAKULÁSA SORÁN (SZATMÁRI ÁGNES, BOZSÓ ZOLTÁN)

A pályázat segítségével sikerült a dohánylevélben nagyszámú BR alatt aktiválódó gént azonosítani (Szatmári et al., 2006). A korábban szubtrakciós módszerrel létrehozott cDNS könyvtár segítségével cDNS chipet állítottunk elő (a Szegedi Biológiai Központ Funkciós Genomikai Csoportjával együttműködve), mely 890 db 6 és 48 órával a *P. syringae hrcC* HR-negatív mutánsával végzett fertőzés után vett mintából izolált klónt tartalmazott. A chipen a BR alatt aktivációt mutató klónok szekvenciáját meghatároztattuk (461 db) majd az azonos génhez tartozó klónokat azonosítottuk. A klónok ismétlődése miatt végül 176 darab egyedi aktiválódó gént különítettünk el. A leggyakrabban előforduló gének között volt pl.

ortometil-transzferáz, glicin-gazdag protein, glutation-S-transzferáz. Gyakori elfordulásuk összhangban volt a BR alatti nagymértékű aktivációjukkal amit specifikus primerek segítségével valós idejű PCR-el mértünk. A géneket a sejtben betöltött funkciójuk szerint csoportosítottuk. Ez alapján a BR alatt aktiválódó gének között nagy számban voltak jelen a jelátviteli folyamatokban résztvevő gének (10%), a sejtfalerősítéssel és másodlagos anyagcsere-utakkal kapcsolatos (összesen 15%), illetve különböző védekezéssel kapcsolatos gének (PR fehérjék, stb. 9%). Ezen kívül protein anyagcserével, sejtvédelemmel, transzport folyamatokkal kapcsolatos géneket is találtunk. Az ismeretlen funkciójú gének aránya is magas volt (28%) (5. Ábra).

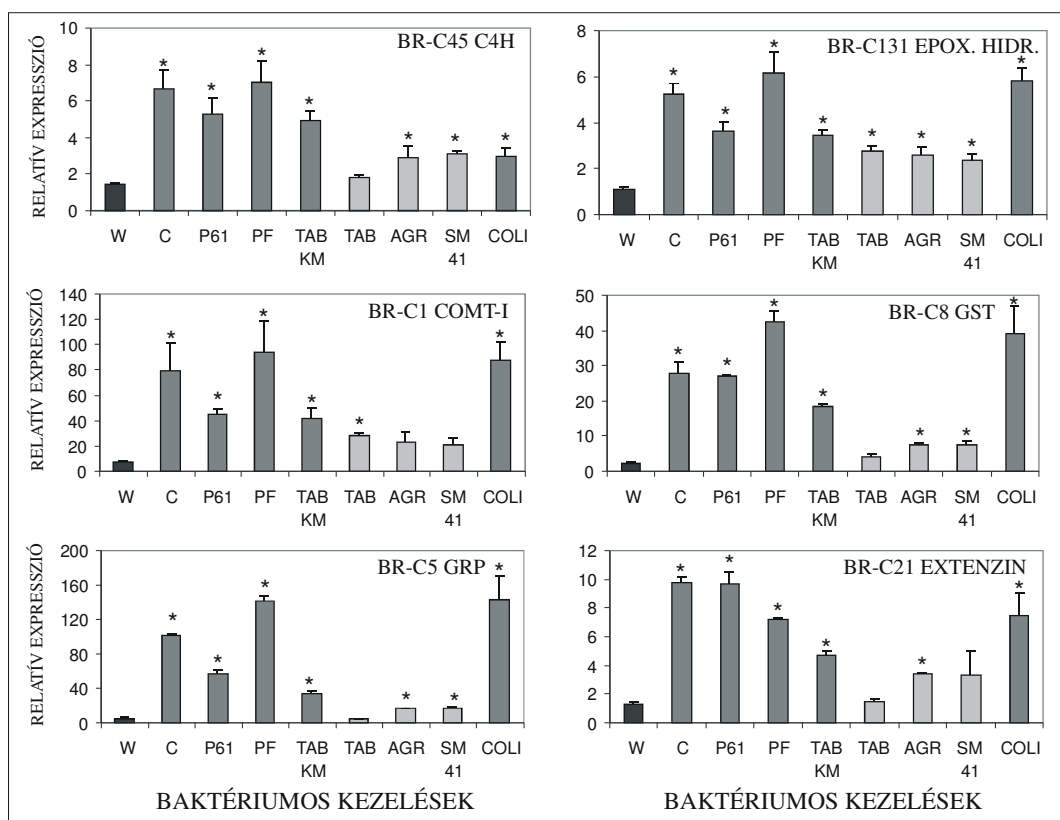


5. Ábra. BR alatt aktiválódó géncsoportok

Az általunk elkészített chip eredményeinek megerősítéséhez, illetve az eredmények kiszélesítéséhez lehetőséget adott, hogy a nemzetközi genomikai kutatások egyik központja a The Institute for Genomic Research (TIGR) elfogadta témajavaslatunkat és lehetőséget biztosít az általuk készített burgonya chip használatára. A Solonaceae csoportba tartozó növények közötti nagyfokú genomi hasonlóság tette lehetővé, hogy az általunk elkészített dohányból vett és tisztított RNS mintákat a TIGR munkatársai a burgonya chipen hibridizálhassák. A BR korai (6 óra) és késői (48 óra) fázisában vett minták mellett (melyeket *P. syringae hrcC* HR-negatív mutánsával infiltráltunk) a vad típusú *P. syringae* (HR-pozitív) fertőzött növényi mintákat is készítettünk a HR és a BR összehasonlítása érdekében, továbbá a kompatibilis kórokozóval is fertőztünk, hogy az betegséget kiváltó kórokozó BR-t elnyomó hatását is vizsgálni lehessen. A hibridizációk eredménye bekerült a TIGR mindenki számára szabadon elérhető adatbázisába (www.tigr.org/tdb/potato/microarray_desc.shtml). Az eredmények azt mutatták, hogy a dohány levelében több a chipen lévő közel 11000 génből a BR alatt több száz (6 órával a ferőzés után 497 db) gén aktivitása változott meg. Az aktiválódó gének mellett sok BR alatt represszált gént is találtunk, melyek az általunk készített chip-el korábban nem voltak vizsgálhatóak. A HR és a BR alatt aktiválódó gének között nagy számban találtunk olyanokat melyek mindkét védekezési típusban megváltozott aktivitást mutattak, ami a két védekezési reakció szoros együttműködésére utal.

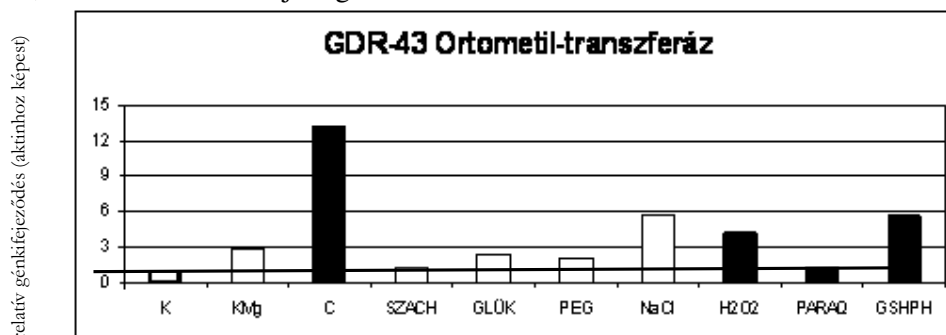
3.1.1 AZ ÁLTALÁNOS REZISZTENCIA SORÁN AKTIVÁLÓDÓ GÉNEK TRANZKRIPCIÓS VÁLTOZÁSAI KÜLÖNBÖZŐ BIOTIKUS ÉS AZ ABIOTIKUS STRESSZEK HATÁSÁRA

A valós idejű RT-PCR-el történt mérésekkel más biotikus stresszre, így a vírusfertőzésre adott növényi válasz folyamán is követtük néhány, a baktérium indukálta BR alatt aktiválódó gén átíródását (6. Ábra.). A vizsgált gének többsége az inkompatibilis vírus (TMV)-dohány kapcsolatban aktivációt mutatott (Zsiros et al. 2007). A különböző baktérium eredetű elicitorok közül (flagellin protein, LPS, peptidoglikán), a flagellin bizonyult a legerősebb hatású elicitornak. A növényvel különböző jellegű kapcsolatot kialakító baktériumok által kiváltott génaktivációkat is összehasonlítottuk, azt tapasztaltuk, hogy eltérő mértékben, de a patogén és a nem patogén baktériumok is aktiválták a BR gének kifejeződését. Az élő betegséget kiváltó kompatibilis baktérium (*P. tabaci*) több esetben viszont gátolni tudta a védekezési gének transzkripcióját.



6 ábra. Dohánygén expressziós mintázatai különböző baktériumokkal (10^8 CFU/ml) történt kezelések után 6 órával. A függőleges tengelyen az abszolút kontrollhoz viszonyított transzkripciós szintet tüntettük fel. Az értékeket a konstitutív aktin génnel normalizáltuk. Jelölések: W: vizes kontroll; C: *P. syringae* hrcC mutáns; P61: *P. syringae* pv. *syringae* 61; PF: *P. fluorescens* TAB KM: kanamicinnel inaktivált *P. tabaci*; TAB: *P. tabaci*; COLI: *E. coli*; AGR: *A. tumefaciens*; SM 41: *S. meliloti*. A hibavonalak a SEM értéket jelölik (n=3). A csillagok (*) a vizes kontrolltól szignifikánsan ($P < 0.05$) eltérő kezeléseket jelölik.

A gének egy része kisebb mértékben abiotikus stresszre pl. mechanikus, ozmotikus, só stresszre, illetve oxidatív stresszre is aktiválódott. Példaként a 7. Ábrán a baktérium indukálta BR alatt aktiválódó ortometil-transzferáz gén expressziós szintjét mutatjuk be ozmotikus és oxidatív stresszt kiváltó kezelések hatására. Az eredmények tehát azt mutatták, hogy az abiotikus stresszek egy része képes a baktérium indukálta BR-hez hasonló változásokat kiváltani, ami a BR általános jellegét erősíti.



7. Ábra. Jelölések: K=kontroll nem kezelt, 10 mM MgCl₂ (a baktériumot ebben szuszpendáltuk), SZACH: szacharóz, 2%, GLÜK: glükóz, 0,5%, PEG: 9%, NaCl: 100mM, H₂O₂: 10mM, PARAQ: paraquat, 0,2 µM, GSHPH: glutation, 1mM pH 6.5.

3.1.2 A BR ALATT AKTIVÁLÓDÓ EGYES FONTOSABB GÉNCSOPORTOK: A HOZZÁJUK KAPCSOLÓDÓ FOLYAMATOK RÉZSLETESÉBB VIZSGÁLATAI: A JELÁTVITELBEN ÉS TRANZKRIPCIÓBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK:

A szubtrakció könyvtár klónjai tartalmazó chip segítségével azonosított, BR alatt dohánylevélben aktiválódó gének funkció csoportjai között a jelátvitelben, illetve transzkripcióban szerepet játszó gének nagyobb számban fordultak elő (18 gén). Voltak közöttük kinázok, foszfatázok, receptorok stb. Az alábbi táblázat az e csoportba sorolható azonosított géneket és ezek aktivációját mutatja 6 és 48 órával a HR-t nem indukáló *P. syringae hrcC* mutánsával végzett fertőzés után. (csillaggal jelöltük a t-próbával, a vizes kontrollokhoz képest 90% biztonsággal történt szignifikáns változást).

Contig	Géntermék neve	Átlag 6h / aktiváció	SD 6h / szignifikáns	Átlag 48h / aktiváció	SD 48h / szignifikáns
c24	NtMKP1 MAP kináz	1,53	0,39	2,89 ↑	0,65 *
c53	CDPK4 kalcium-függő protein kináz	3,85 ↑	0,85 *	2,74 ↑	1,23
c55	14-3-3 szabályozó fehérje izoforma	3,04 ↑	2,59	1,54	0,60
c58	MAP3K-szerű fehérje	4,12 ↑	1,76 *	1,76	0,58
c59	CND41 kloroplasztisz-specifikus DNS-kötő fehérje	1,07	0,20	5,56 ↑	5,30
c90	receptor-szerű protein kináz	1,61	0,47	2,28 ↑	0,65 *
c95	Avr9/Cf-9 gyorsan elicitált protein (hasonlóság kalcium-kötő fehérjéhez)	9,28 ↑	5,37 *	8,83 ↑	6,94 *
c106	lehetséges PTS HPR szerin foszforilációban résztvevő protein	1,45	0,66	3,72 ↑	1,54 *
c108	etilén képző enzim (EFE)	2,06 ↑	1,19	2,77 ↑	1,28 *
c125	annexin-szerű, kalcium-függő foszfolipid-kötődés	2,25 ↑	0,53 *	5,40 ↑	2,44 *
c135	Rav transzkripciós faktor	3,58 ↑	1,05 *	3,25 ↑	0,81 *
c144	WD ismétlődést tartalmazó AN11 fehérje	2,97 ↑	1,22 *	1,88	1,07
c151	NtHSF1 transzkripciós faktor	7,03 ↑	3,21 *	2,64 ↑	1,87 *

E jelátviteli gének termékei szabályozzák elsődlegesen azokat a folyamatokat, melyek a védekezési reakciók kifejlődéséhez vezetnek. Ezért ezeknek a útvonalaknak a részletesebb megismerése elengedhetetlen a BR létrejöttének megértéséhez.

A chip által kapott adatok ellenőrzése, illetve a gének aktivációjának részletesebb lefutását a érdekében az egyes génekre specifikus primereket terveztünk és a génkifejeződés szintjét valós-idejű PCR-el követtük a fertőzés után vett különböző időpontokban vett mintákban.. Az eredmények azt mutatták, hogy a chip-el kapott eredmények megbízhatóak. A gének egy része a fertőzés után gyorsan aktiválódott (ezek kötődhetnek a korai BR kialakulásához), míg más gének a fertőzés későbbi szakaszában mutattak emelt szintű kifejeződést és valószínűleg a védekezési reakció fenntartásában játszhatnak szerepet. Ezen kívül olyanok is voltak melyek a korai és a késői időpontban is aktívak voltak.

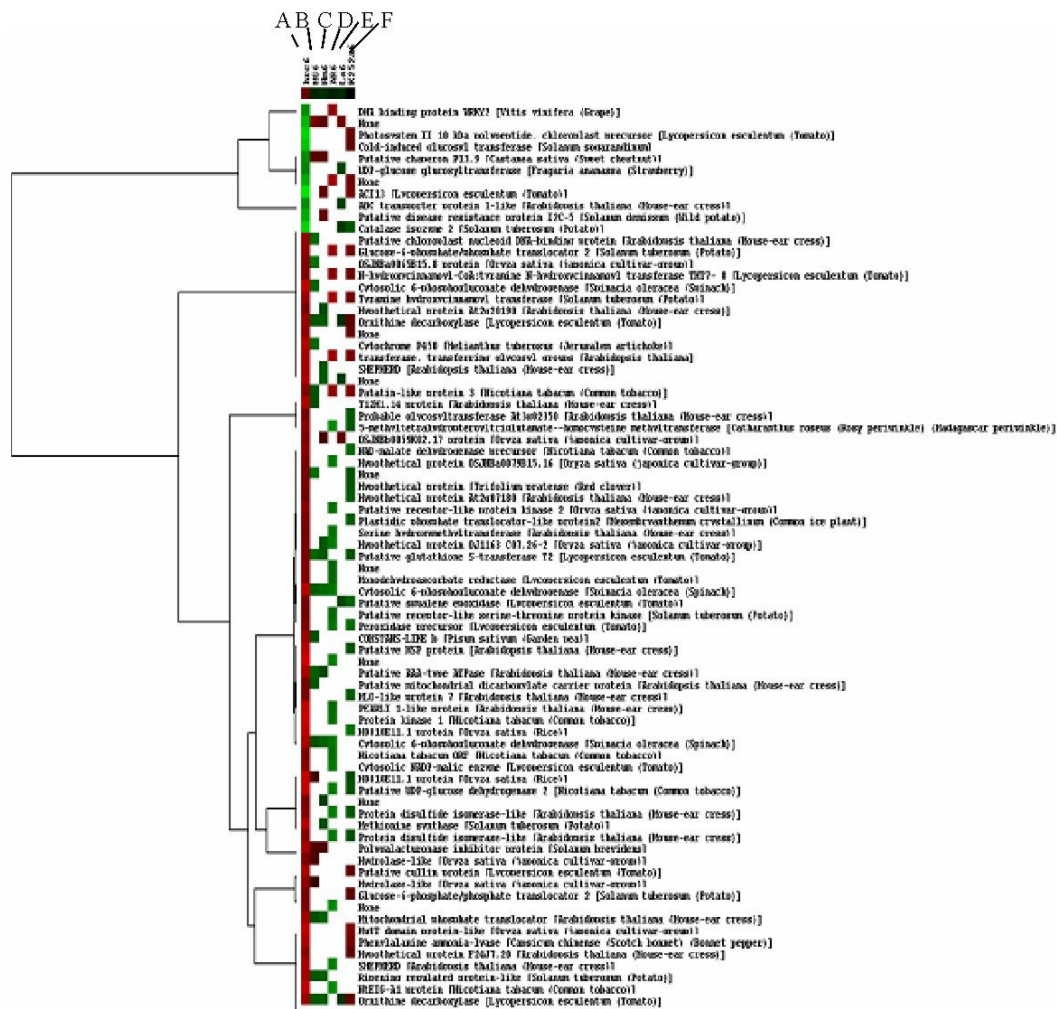
A JELÁTVITELBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATAI:

Az egyes gének, illetve az egyes gének által megjelenített jelátviteli utak szerepének tanulmányozásához kétféle módszert próbáltunk ki. Egyrészt olyan Arabidopsis mutánsokkal kezdtünk el dolgozni melyek az általunk azonosított dohány génekkel homológok, és a szabadon hozzáférhető expressziós adatbázisok alapján BR alatt aktiválódnak. Ezeknek az Arabidopsis mutánsok magjait a nemzetközi maggyűjteményből elkértük (17 db mutáns törzs). Első lépésként a T-DNS segítségével előállított mutánsokból öntermékenyítéssel homoizogótákat hoztunk létre, melyet genomi PCR reakciókkal ellenőriztünk. Majd a homoizogótákat felnevelve a BR jelenlétére, illetve hiányára utaló jeleket kerestünk megfelelő BR markerek (pl. növényi sejtfalban történő kallóz lerakódás vagy a fertőzés utáni baktériumszám változás mértékének megváltozása). Az eddig vizsgált mutánsok közül az etilén szintézisben sérült Arabidopsis esetében lehetett gyorsabb baktériumszám növekedést tapasztalni, ha az Arabidopsist megfertőzni képes kompatibilis *P. syringae* pv. *tomato* baktériummal végeztük a fertőzést.

A dohányban esetében a jelátviteli gének szerepét géncsendesítési módszer segítségével kezdtük el meghatározni. Ehhez az ún. SVISS módszer adoptálását végeztük el. Ebben a rendszerben a csendesíteni kívánt gén egy rövid kb. 150-200 bp szakaszát egy szatellit vírusba kell klónozni. A növény fertőzését a szatellit vírus és a helper vírus TMV-U2 együttesével kell végezni. E rendszer előnye többek között az, hogy a szatellit vírusnak köszönhetően enyhébb vírus okozta tüneteket kapunk. Sikeres tesztkonstrukcióval történt fertőzéseket követően a fertőzés hatékonyságának és a könnyebb szelektálhatóság érdekében a rendszeren több változtatást is végrehajtottunk. A szatellit vírust *A. tumefaciens* expressziós vektorba klónoztuk, miáltal a fertőzés egyszerűbbé vált, mivel a baktérium injektálásával, elkerülhetővé vált a szatellit vírus átírása *in vitro* transzkripcióval. A vírusfertőzés eredményességének, illetve a géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzésére a szatellit vírusba teljes fluoreszkáló GFP gént, illetve egy másik konstrukcióba egy kb. 150 bp hosszú GFP géndarabot klónoztunk. Ez utóbbi esetben a kívánt csendesíteni kívánt gént kónozása a GFP géndarab mögé történik, s a géncsendesítés hatékonyságát olyan dohány követhettük, mely a GFP fehérjét folyamatosan termelte. Eddig 7 db jelátvitelben szerepet játszó gén esetében (pl. MAP kináz) készítettük el és teszteltük a géncsendesítés hatását a BR-el kapcsolatba hozható folyamatokra (pl. baktérium sejtszámváltozás), azonban szignifikáns hatást még nem tapasztaltunk. További gének vizsgálata és/vagy (a jelátviteli utak párhuzamosságai és átfedései miatt) több szignál útván résztvevő gén egyidejű csendesítése vezethet eredményre a későbbiekben.

A JELÁTVITELI FOLYAMATOKAT GÁTLÓK MOLEKULÁK HATÁSA A BR KIALAKULÁSÁRA:

Különböző jelátviteli utakat gátló anyagok használata ugyancsak közelebb vihet az egyes BR-ben szerepet játszó szignál utak szerepének megismeréséhez. A gátolt szignál folyamatok a következők voltak (zárójelben a használt inhibitorok): Ca^{2+} beáramlás (LaCl₃), foszfolipáz C (neomicin), foszfolipáz A (aristolochic sav), foszfolipáz D (butanol) kináz gátló (K252a), illetve a proteoszómás úton történő fehérjelebontást gátló (MG115). Az inhibitorokat a BR-t kiváltó *P. syringae hrcC* mutánsával együtt injektáltuk. Mivel a baktérium aktivitása nem szükséges a BR kiváltásához az egyes gátló anyagok hatását nem kellett a baktériumoknál figyelembe venni. Az inhibitorok hatását elsődlegesen a jól mérhető génexpressziós változásokon követtük.



8. Ábra. Jelölések: A kontrollhoz képest aktiválódó géneket piros, míg a represszáltakat zöld szín jelzi. Az aktiváció vagy a gátlás mértékét a szín intenzitása mutatja. Az első oszlop a gén BR alatti aktivitását jelöli a vizes kontrollhoz képest. A többi oszlop az inhibitorok hatását mutatja a csak baktériummal kezelt mintához képest. Kezelések **A)** *P. syringae hrcC*, **B)** *P.s hrcC*+proteoszómás protein lebontás gátlása, **C)** *P.s hrcC*+foszfolipáz C gátlás, **D)** *P.s hrcC*+foszfolipáz A gátlás, **E)** *P.s hrcC*+ Ca^{2+} beáramlás gátlás, **F)** kináz gátlás. Az ábra a Cluster3.0 program segítségével készült.

Mivel a TIGR által elfogadott javaslataink között a jelátviteli gátló inhibitorok felhasználása is szerepelt ezért lehetőségünk volt a burgonya chipet használva a jelátviteli folyamatok szerepét a gének széles körén megvizsgálni.

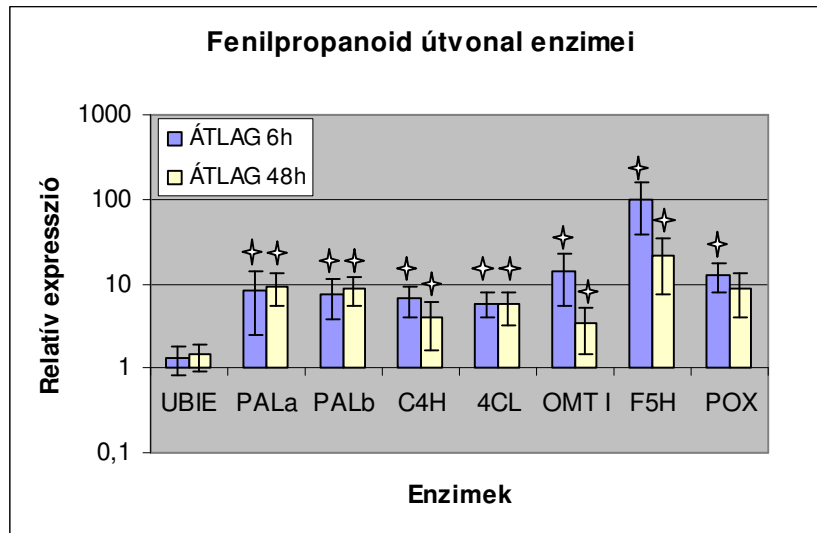
A chip eredmények kiértékelése után azt kaptuk, hogy a bugonya chip-et használva a a fertőzés után 6 órával a dohányban 497 db BR alatt megváltozott aktivitást mutató gént kaptunk, ebből 5 inhibitorot használva (kivéve a foszfolipáz D gátlót) 77 db olyan gént kaptunk mely valamilyen irányba megváltoztatta az aktivitását a BR alatt tapasztaltakhoz képest (8. Ábra).

A változás iránya az inhibitorok hatására többféle is lehetett. A legjellemzőbb, az egyes BR alatt aktiválódó gének gátlása mellett, azt is megfigyelhettük, hogy egyes represszált gének az inhibitor(ok) hatására aktiválódtak, vagy az aktivált gén kifejeződése tovább növekedett. Ezek a jelenségek a szabályozási folyamatok összetettségét támasztják alá. Bizonyos átfedések az egyes inhibitorok hatásában megfigyelhetőek voltak. Az adatok azt mutatták, hogy a foszfolipáz A és a kinázok által szabályozott utak átfednek egymással (12 gén esetében), ami egybe esik az irodalmi adatokkal mivel ismert a foszfolipáz A zsírsavakon keresztüli kináz regulációs funkciója. A foszfolipáz C és a proteosomás lebontás gátlásának eredménye is közös szabályozási utat jelez (11 gén esetében).

Az inhibitorok hatását a BR alatt aktiválódó génekre részletesebben is követtük génspecifikus primerek és valós idejű PCR segítségével. A vizsgált aktiválódó gének között voltak a jelátvitelben és a védekezési reakcióban potenciálisan résztvevő gének is. A fertőzés korai fázisától kezdve több időpontban figyeltük a gének aktivitásának változását az inhibitorok hatására. A valós idejű PCR-el végzett kísérletek számos BR alatt aktiválódó gén esetében sikerült az aktiváció szintjét csökkenteni. Ezek az eredmények alátámasztották a chip-el kapott eredményeket. Pl. A foszforilációt gátló K252a inhibitor a BR alatt aktiválódó gének transzkripcióját eltérő módon változtatta meg. Egyes gének átíródását gátolta, míg másokét fokozta. A transzkripció eredménye tehát a szabályozás komplexitását jelzi.

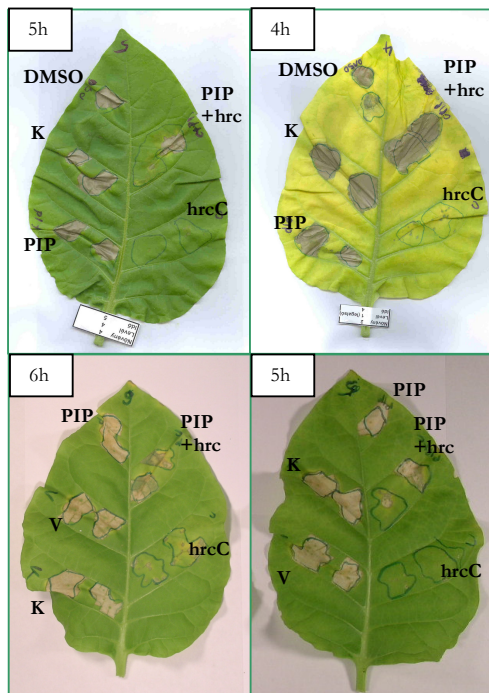
A FENILPROPANOID ÚTVONAL GÉNJEI ÉS AZ ÚTVONAL SZEREPE A BR ALATT:

A dohány szubsztrakciós könyvtárral kapott eredmények, korábban a *Medicago truncatula* chipel végzett kísérleteink, valamint az irodalmi adatok is azt mutatták, hogy a fenilpropanoid útvonal enzimei szinte kivétel nélkül aktiválódnak az általános rezisztencia során. A lignin irányába vezető reakciókat katalizáló enzimek nagyobb része jelen van az aktivált gének között. Hiányzott azonban a koenzim-A-hoz kapcsolt vegyületeket alkohollá alakító két enzim (CCR és CAD). A reakcióút elágazik először a szalicilsavtermelés irányába (a fahéjsav után), majd az antocianinok, flavonoidok stb. irányába a kumaroil-koenzim-A után. Ezeket az elágazásokat egy gén sem képviselte, bár a különféle növényi védekezési reakcióknál gyakori mind a szalicilsav, mind a flavonoidok, antociánok megjelenése. A 9. Ábra mutatja a fenilpropanoid útvonal néhány génjének aktivációját a BR alatt. Itt a gének kifejeződésének szintjét valós idejű PCR reakcióval mértük az UBIE konstitutív génhez viszonyítva.



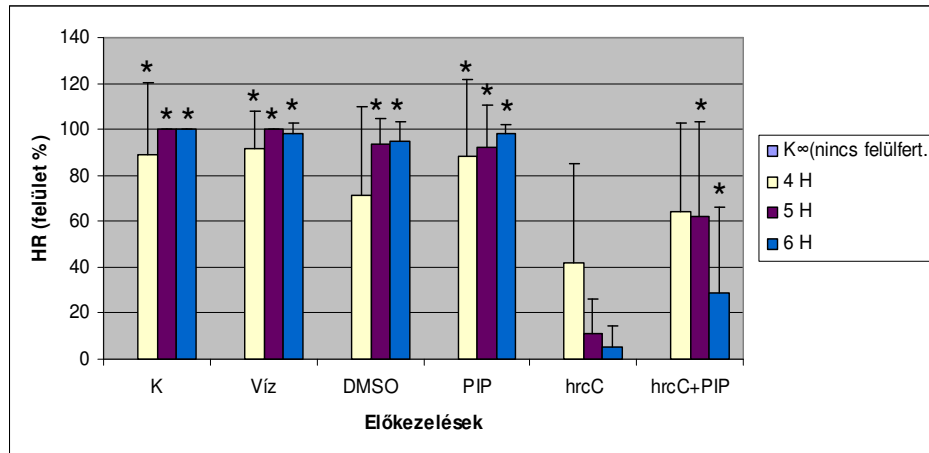
9. Ábra. Jelölések: A csillagok a: t-próbával, a vizes kontrollokhoz képest 90% biztonsággal szignifikánsan eltérést mutató géneket jelöli (PAL= phenylalanine ammonia-lyase, C4H= cinnamate 4-hydroxylase, OMTI: O-methyltransferase, F5H= ferulate 5-hydroxylase, POX=peroxidáz.

Szerettük volna megvizsgálni, hogy vajon ezen anyagcsere-útvonal működésének megzavarása okoz-e kimutatható változást az általános rezisztencia hatékonyságában. A fenilalaninból kiinduló fenilpropanoid útvonalban a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) után a fahéjsav-4-hidroxiláz enzim (C4H) a második enzim. Ez az anyagcsere-útvonal vezet el a növényi pigmentek, lignin és számos védekezéssel kapcsolatos molekula keletkezéséhez. A fahéjsav-4-hidroxiláz enzim (C4H) által katalizált reakció sebesség-meghatározó lépést jelent a folyamatban. A C4H gátlásával várhatóan csökken az általános rezisztencia hatékonysága. A piperonil-sav (PIP) hatékony, szelektív, kvázi-irreverzibilis inhibitora a C4H-nak (Schalk et al. 1998). A BR HR-gátló tulajdonságát használtuk fel a fenilpropanoid útvonal esetleges szerepének kimutatására. A BR-t a *P. syringiae hrcC*-t injektálásával aktiváltuk. A BR esetleges gátlásához a PIP-et együtt injektáltuk *P. syringiae hrcC* baktériumokkal, kontrollként vizet és DMSO-t (a PIP oldószere) és önállóan PIP-et használtunk. 4, 5 és 6 óra múlva az előkezelt levélfelületeket felülfertőztük a *P. syringiae* pv. *syringae* inkompatibilis HR-t okozó baktériummal, 1-1 előkezelt levelet pedig felülfertőzés nélkül hagytunk. A kifejlődött tüneteket másnap értékeltük (10. Ábra).



10. Ábra. A fenilpropanoid utat gátló PIP hatása a BR-re (HR gátlás). A vízzel, DMSO-val, PIP-pel vagy előkezelés nélküli levélrészfelületeken a HR minden időpontban a teljes kezelt felületen kifejlődött. A *P. syringiae hrcC* baktériummal előkezelte felületen egyáltalán nem, vagy csak elenyésző méretű foltban alakult ki HR. A *P. syringiae hrcC* + PIP kombinációval előkezelte levélfelületen gyakrabban, és nagyobb felületen jelentek meg HR foltok azaz a PIP gátolta a BR részlegesen gátolta a BR kifejeződését (**K** – előkezelés nélküli kontroll, **DMSO** – Dimetil szulfoxid, oldószer, **V** – víz, **PIP** - piperonil-sav, **hrcC** - *P. syringiae hrcC*). Az órák előkezelés és felülfertőzés között eltelt időt jelzik.

A számszerűsített adatok (11. Ábra) is alátámasztották, hogy a PIP-pel kombinálva a *hrcC* mutáns *P. syringiae* nem képes olyan mértékben indukálni az általános rezisztenciát, ezáltal kivédeni a HR-t, mintha csak önmagában lett volna jelen. 5 és 6 órával a fertőzés után lehetett a baktérium és a baktérium-PIP kezelés között szignifikáns különbséget találni.

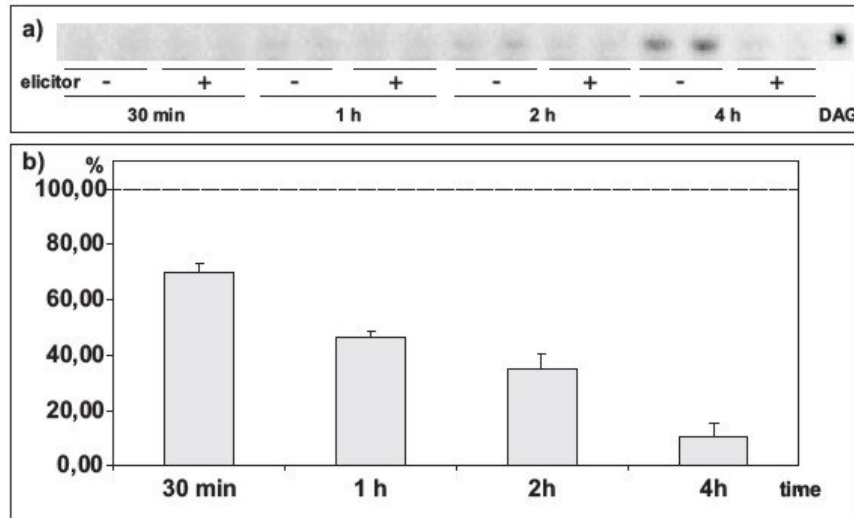


11. Ábra: A fenilpropanoid utat gátló PIP hatása a BR-re (HR gátlás). Különböző előkezelések után tapasztalt HR-kialakulás *P. syringiae* inkompatibilis törzsszel való felülfertőzést követően. A függőleges tengelyen a HR kiterjedését adtuk meg az előkezelt felülethez viszonyítva, százalékos értékben. (**K** – előkezelés nélküli kontroll, **DMSO** – Dimetil szulfoxid, oldószer, **V** – víz, **PIP** - piperonil-sav, **hrcC** - *P. syringiae* hrcC). Az órák előkezelés és felülfertőzés között eltelt időt jelzik. Csillag: szignifikáns eltérés ($p < 0.05$). az adott időpontnak megfelelő *P. syringiae* hrcC kezelésnél kapott értéktől.

Az eredmények tükrében azt mondhatjuk, hogy a fenilpropanoid bioszintetikus útvonal korai fázisban való gátlása csökkentette a BR hatékonyságát. Ez a sejtfalak megerősítésével lehet kapcsolatban. Ez összhangban van a baktérium és a növénysejt érintkezési pontjánál látható papillaképződésről szóló leírásokkal.

3.1.2.1 KÜLÖNBÖZŐ BAKTÉRIUM EREDETŰ ELICITORMOLEKULÁK ÉS NÖVÉNYI JELÁTVITELI MOLEKULÁK HATÁSA

Mivel a foszfolipid anyagcsere, ezen belül a PLC esetleges szerepe a BR-ben genomikai munkánk során felmerült, biokémiai kísérleteket végeztünk a kérdés közelebbi vizsgálatára. Ehhez közelebbi alkalmat adott a tény, hogy nemrégiben cseh és német kutatóknak sikerült kimutatni egy foszfatidilkolin (PC)-specifikus PLC (PC-PLC) aktivitást dohány sejt kultúrában, bizonyos elicitor kezeléseket után Scherer et al., 2002. Ezért a cseh kollégákkal megmértük a diacilglicerol (DAG) szintjét dohány levelekben, BR alatt. A DAG-ot kétféle PLC enzimaktivitás termelheti: foszfatidil inozitolból vagy PC-ből kiindulva. Megkülönböztetésük specifikus, fluoreszcensen jelölt szubsztráttal (BODIPY-PC) történt. A zöld levelekből származó mintákban a klorofill vagy klorofillszerű anyag zavarta a jelölt DAG kimutatását, ezért a sejt kultúrára kidolgozott vékonyréteg kromatográfiás körülményeket át kellett alakítani. Maguk a mérések pedig azt mutatták, hogy a jelölt DAG szintje a kezelt levelekének akár 10%-áig is lecsökkent (12. Ábra), ami azt jelzi, hogy a BR elicitorai gátolják a PC-PLC aktivitását. Farmakológiai inhibitorokkal nem jutottunk volna erre az eredményre.



12. Ábra. Diacilglicerol mennyisége BR alatt. a), nagy hatékonyságú vékonyréteg kromatográfia; b), denzitometrált mennyiségi értékek a 0. időpont százalékában. DAG, diacilglicerol.

3.1.2.2 A BR SORÁN AKTIVÁLÓDÓ GÉNEK SZABÁLYOZÓ RÉGIÓJÁNAK ELEMZÉSE.

A BR alatti transzkripció szabályozás megértésének fontos része a védekezési reakció alatt megváltozott aktivitást mutató gének szabályozó régióinak elemzése. Olyan motívumokat kerestünk, melyek kötő helyei lehetnek az adott gén transzkripció faktorainak. Jelenleg két BR alatt aktiválódó dohány gén (a *tpoxN1* és a *CHO3d9* kitináz) promóter régiója áll a rendelkezésünkre, ami inverz-PCR, illetve genomi PCR segítségével lett izolálva. A BR aktivációja során mindkét gén gyorsan indukálódik. A kitináz már 1-2 órával a fertőzés után is emelt transzkripciót mutat, míg a peroxidáz gén 6-12. órában éri el az aktivitása maximumát. A peroxidáz emellett a mechanikai sérülésre is aktiválódik. A promóter régióik elemzése (PlantCare program) azt mutatta, hogy számos biotikus és abiotikus válaszokkal kapcsolatba hozott transzkripció faktor kötőhely megtalálható a szabályozó régióikban pl. elicitor kezelésre aktiválódó gének szabályozó régióiban található motívumok (EIRE box, ELI-box3); szalicilsav kezelésre aktiválódó gének promóter régiójában talált motívum (TCA nbox) stb. Különbségeket is találtunk a két régió motívum összetételében. A peroxidáz génnel ellentétben a kitináz gén szabályozó szakasza tartalmazza az ún. W boxot is ami számos védekezésben résztvevő gén előtt megtalálható, és a WRKY transzkripció faktorok kötőhelyéül szolgál. A peroxidáz szabályozó régiója viszont a mechanikai stresszre adott válasznak megfelelően tartalmazza az ún. WUN motívumot, ami a sérülésre aktiválódó génekre jellemző. Számos BR alatt aktiválódó dohány gén *Arabidopsis* homológjának (jelátvitelben szerepet játszó gének) szabályozó régiójának összetételét is megvizsgáltuk és a dohánygénekhez hasonlóan a védekezési reakciókkal kapcsolatba hozható motívumok pl. (W box és ELI) jelenlétét tapasztaltuk. További dohány szabályozó régiók izolálása és elemzése fogja megmutatni a BR-aktivációjához szükséges fontos szekvenciákat, melyeket fel lehet majd használni a gének szabályozott kifejeztetéséhez.

MEGJEGYZÉS

A projekt jelentős eredményeinek egy része publikációban az elkövetkező 2 évben fog megjelenni. Ezért kérjük, hogy a minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa.

ÖSSZEFOGLALÁS/SUMMARY

A növényi általános rezisztencia (BR) a leggyorsabb védekezési válaszrendszer mikrobiális fertőzésre. Mi folytattuk a BR kutatási hagyományainkat, immár molekuláris szinten is. A BR erősen függött bizonyos környezeti tényezőktől, elsősorban a hőmérséklettől. A proteomikai vizsgálatok számos új fehérjét mutattak ki a sejtfalból, mely a baktériumokkal szembeni harc színtere. Egy BR-hez kapcsolható kitináz sikerült klónozni, részlegesen tisztítani és jellemezni, főleg ami baktérium-eredetű szubsztrát (pl. baktérium sejtfa-összetevők) bontási képességeit illeti. A kitináz a BR egyik valószínű effektora. A baktérium vizsgálatokban fény derült pl. arra, hogy a BR gátolja a baktériumok patogenitási génjeinek kifejeződését. Szubtraktált cDNS könyvtár és a klónok segítségével készült chippel sikerült a dohány levélben nagyszámú BR alatt aktiválódó gént azonosítani (176 db), továbbá nagy számú gént tartalmazó chip segítségével az eredményeket megerősíteni, kiszélesíteni. A megváltozott aktivitást mutató azonosított gének funkciói növényi folyamatok széles körét érintik. A BR és más biotikus és abiotikus stresszek közötti átfedéseket figyeltünk meg a génkifejeződés szintjén. A jelátviteli folyamatok és a fenilpropanoid szintézis szerepét részletesebben is tanulmányoztuk. Vizsgálataink szerint egyes szignál utak (pl. foszfolipáz A és C és a foszforiláció) fontos szerepet töltenek be a BR szabályozásában. A fenilpropanoid út gátlása a BR kifejlődését gyengítette.

Basal resistance (BR) of plants is the quickest defence response to microbial infection. We continued our traditions of BR research, now on the molecular level as well. BR was heavily dependent on some environmental factors, especially temperature. Proteomics revealed several novel proteins from the cell wall, which is the playground for fighting bacteria. We succeeded in cloning, partially purifying and characterizing an EBR-related chitinase, with a focus on its ability to degrade substrates of bacterial origin (e.g. bacterial cell wall constituents). This chitinase probably represents an effector of BR. Studies on the bacterial side showed for example, that BR inhibits expression of bacterial pathogenicity genes. With a gene chip based on a subtraction cDNA library and clones we could identify a large number (176) of genes activated under BR and assert and widen these data using a high density gene array. The functions of genes with modified expression cover a wide range of physiological processes. On the transcriptional level we observed an overlap between BR, other biotic and abiotic stresses. Roles of certain signal transduction pathways and the phenylpropanoid synthesis pathway has been studied in more detail. Results indicated that signalling routes like phospholipase A, C and phosphorylation are important for controlling BR. Inhibition of the phenylpropanoid pathway attenuated development of BR.

IDÉZETT IRODALOM (PÁLYÁZAT RÉSZTVEVŐI ALÁHÚZVA, *JELEN OTKA TÁMOGATÁS SEGÍTSÉGÉVEL)

- *Besenyei, E., Ott, P. G., Bozsó, Z., Czelleng, A., Szatmári, Á., Varga, G. J., and Z. Klement 2005. Low temperature delay and inhibition of a plant defence mechanism: early basal resistance in tobacco. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 40: 323-332.
- Bozsó, Z., Ott, P. G., Kecskés, M. L., and Z. Klement 1999. Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrmA* mutants to cause HR. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 215-223.
- *Bozsó Z, Ott PG, Klement Z: Nem-specifikus növényi rezisztenciaválaszok baktériumos fertőzés esetén (korai és késői általános rezisztencia) In: Molekuláris Növénykórtan: Támadás és védekezés (Ed.: Gáborjányi Richard, Király Zoltán), Budapest (2007), pp. 159-165
- Burgyán, J., and Z. Klement 1979. Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathol. Mediterr.* 18: 153-161.
- Chatterjee, A., Cui, Y., and A. K. Chatterjee 2002. Regulation of *Erwinia carotovora hrpL(Ecc)* (σ -L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 971-980.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R., and A. K. Chatterjee 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1106-1117.
- *Czelleng, A., Bozsó, Z., Ott, P. G., Besenyei, E., Varga, G. J., Szatmári, A., Kiraly, L., and Z. Klement 2006. Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Curr. Microbiol.* 52: 282-286.
- Felix, G., and T. Boller 2003. Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* 278: 6201-6208.
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., and T. Nurnberger 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282: 32338-32348.
- Heeb, S., and D. Haas 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1351-1363.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M. L., Besenyei, E., Arnold, C., and P. G. Ott 2003. Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Manag. Sci.* 59: 465-474.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and G. Felix 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507.
- Lovrekovich, L., and G. L. Farkas 1965. Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature* 205: 823-824.
- *Moricz, A., Ott, P. G., Billes, F., Otta, and E. Tyihak 2007. The influence of L-ascorbic acid on the antibacterial - toxic activity of aflatoxins on adsorbent layer. *J. Appl. Microbiol.* 103:2525-2532.
- *Ott PG, Bozsó Z: Basal resistance of plants against bacteria. In: *Plant-Microbe Interactions*, ISBN: 978-81-308-0212-1, (Ed.: E. Ait Barka and C. Clément), Research Signpost, Kerala, India (2008), pp. 135-168. (in press)
- *Ott, P. G., Varga, G. J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyei, E., and E. Szabó 2006a. Basal resistance of plants against bacteria: from discovery to molecular characterisation. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 41: 37-46.
- *Ott, P. G., Varga, G. J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzky, K. F., Czelleng, A., Besenyei, E., and Z. Klement 2006b. Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial cell components and suppressed by virulent bacteria as an indication of early basal resistance in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 161-172.
- Scherer, G. F., Paul, R. U., Holk, A., and J. Martinec 2002. Down-regulation by elicitors of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 766-770.
- *Szabó, E., Klement, É., Medzihradzky, K. F., Varga, G. J., Besenyei, E., and P. G. Ott 2006. Changes of apoplast protein composition during early basal resistance (EBR) in tobacco. *Cereal Res. Commun.* 34: 677-680.
- *Sárközi, Á., Móricz, M. Á., Ott, P. G., Tyihak, E., and Á. Kéry 2006. Investigation of Chelidonium alkaloids by use of a complex bioautographic system. *J. Protein Chem.* 19:267-272.

- *Szatmári Á, Ott PG, Varga GJ, Besenyei E, Czelleng A, Klement Z, and Z. Bozsó 2006. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep.* 25:728-740.
- *Tyihak, E., Katay, G., Moricz, M. A., Ott, G. P., and Z. Kiraly-Veghely 2007a. Role of formaldehyde and its reaction products in mechanism of action of some plant ingredients. *Acta Pharm. Hung.* 77:53-58.
- *Tyihak, E., Király-Véghely, Z. s., Kátay, G. y., Móricz, Á. M., and P. G. Ott 2007b. BioArena as biodetection system in the study of plant ingredients. *Revista de Medicina si Farmacie* 53:51-61.
- *Tyihak, E., Móricz, Á. M., and P. G. Ott 2008. Bio-detection and determination of biological activity of natural compounds. In: *Thin layer chromatography in Phytochemistry.* (Ed.: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska), CRC Press (megjelenés: 2008.02.19.).
- *Varga G. 2006. A korai általános rezisztenciához kapcsolható új fehérjék és felhasználásuk a rezisztenciát kiváltó baktérium komponensek meghatározására. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar.
- *Varga, G. J., Szegedi, E., Ott, P. G., and E. Szabó 2006. Early basal resistance inhibits tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. *Cereal Res. Commun.* 34: 97-100.
- Wacek, T. J., and L. Sequeira 1973. The peptidoglycan of *Pseudomonas solanacearum*: Chemical composition and biological activity in relation to the hypersensitive reaction in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 3:363-369.
- *Zsiros L., Szatmári A., Palkovics L., Klement Z., and Z. Bozso 2007. Bacterium-induced basal resistance inhibits viral infection in tobacco plants. *Cereal Res. Commun.* 35:1345-1348.