

# Egy új, általános védekezéshez hasonló betegség ellenállóság élettani és molekuláris sajátosságai.

---

*záróbeszámoló*

## Fontosabb rövidítések, definíciók

Bs2: *Xanthomonas euvesicatoria* baktériummal szembeni rezisztencia gén *Capsicum chacoense*-ből. A szövegben a Bs2 tartalmú növényeket is így jelöljük.

DB, TLC: direkt bioautográfia, antibakteriális anyag kimutatása közvetlenül az anyagot elválasztó közegen, pl. vékonyréteg kromatográfiás (TLC) lemezen.

DE, "Differentially Expressed", eltérően kifejeződő: olyan gének v. fehérjék, melyek bizonyos kezelések közötti összehasonlításban különbözően viselkednek.

ETI, HR, effektor: 'Effector Triggered Immunity', általában (sejthalállal) járó rezisztencia, ez esetben hiperszenzitív reakció (HR). A növényi sejtfalon és sejthártyán átjuttatott virulencia fehérjék, az ún. effektorok okozta változásokat felismerő védelmi rendszer, melynek specifikus elemei az ún. rezisztencia fehérjék (R-fehérjék), ilyen pl. paprikában a Bs2.

GDS: "General Defense System", magyar nemesítők által leírt, HR-val nem járó betegség ellenállóság. A recesszív *gds* gén felelős a *Xanthomonas vesicatoria*-val szembeni sajátságos rezisztenciáért és tünetekért. A szövegben a *gds* tartalmú növényeket is így jelöljük.

*hrp*, *hrc* gének, T3SS: Az effektorokat a növényi sejtbe átjuttató, speciális injektor apparátus (Type Three Secretion System, T3SS) szerkezeti fehérjéit és az injektor, más néven Hrp pílus, kifejeződésének részbeni szabályozását kódoló gének. A T3SS működése alapvető feltétele a kórokozó képességnek.

PTI, MAMP: 'Pattern Triggered Immunity', általános baktérium sejtkeponensek, ún. mintázatok ('Microbe Associated Molecular Patterns', röviden 'MAMP') receptoros felismerését követő ősi, baktérium gátló védekező mechanizmus, a virulencia effektorok gyakori célpontja. Szokták még alap rezisztenciának ('basal immunity') is nevezni.

XEU: *Xanthomonas euvesicatoria* magyar törzse.

XS: XEU-ra érzékeny paprika vonal

1e4, 1e5, 1e6, 1e7, 1e8: 10-es szám a jelzett hatványokon.

0, 6, 24 órában: 0, 6, 24 órával a fertőzés után.

## Általános bevezetés

Ez a pályázat a GDS-re mint új típusú rezisztencia mechanizmusára keres válaszokat. A GDS alig ismert azon túl, hogy az ezzel a tulajdonsággal bíró paprikákat a *Xanthomonas* nem betegíti - egy újszerű, ezért fontos rezisztencia jelenségre utalva. Néhány információ már közlésre került a GDS-ről, de elmondható az, hogy a jelenség vizsgálatának, megértésének csak az elején tartunk. A mi megközelítésünk alaputatási jellegű, fő célunk, hogy a GDS-t elhelyezzük az egyetemes ismeretek közé, reményeink szerint új elemekkel is gazdagítva azokat.

Munkánkban hasonló figyelmet fordítottunk mindkét partnerre (paprika és *Xanthomonas*) és arra, hogy "alulról" építkezzünk, tehát nagyszámú lehetőségből (molekuláris adatokból) kiindulva, azokat a rezisztenciához társítva jussunk következtetésekre, nem pedig úgy, hogy a betegség rezisztenciát eddig magyarázó, ismert koncepciókat teszteljük. A munka bemutatásának alábbi felosztása az alkalmazott módszertan (sorrendben: tünettan, (baktérium) sejtszámlálás, transzkriptomika, géncsendesítés, metabolomika és proteomika) alapján történt, ezeken belül a hagyományos cikk szerkezettel (bevezetés, módszer, eredmények, megvitatás), hogy minden információ gyorsan megtalálható legyen.

A kezdő hipotézis az volt, hogy a GDS a PTI extrém erős formája, ezért a projekt során folyamatosan igyekeztünk a GDS-t a PTI-vel ill. ETI-vel, ismert rezisztencia formákkal, párhuzamba állítani.

Hangsúlyozzuk, hogy ez a munka még nem ért véget. Elemzések vannak folyamatban, további publikációk készülnek, ezért az adatok egy részét (pl. a molekuláris funkciókra vonatkozóan) az alábbi összegzésből visszatartottunk. A már közölt publikációkra csak röviden utalunk és csillaggal (\*) különböztettük meg a hivatkozásokban ill. a jegyzékben.

## Kezelések

Növények:

- gds génnel rendelkező dihaploid paprika nemesítési vonal, amelyet kizárólagossággal a Budakert Kft. tart fenn, "GDS".
  - gds és Bs2 génnel nem rendelkező, *Xanthomonas vesicatoria*-ra érzékeny dihaploid nemesítési paprika vonal, amelyet kizárólagossággal a Budakert Kft. tart fenn, "XS".
  - Bs2 génnel rendelkező, *Xanthomonas vesicatoria*-ra rezisztens nemesítési paprika vonal, melyet kizárólagossággal a Budakert Kft. tart fenn, "Bs2".
- a növények "közel izogén" vonalaknak tekinthetők, ami összehasonlíthatóságuknak kedvez.

Baktériumok:

- Hazai *Xanthomonas* izolátum, általunk *X. euvesicatoria*-nak azonosítva, "XEU".
- *Xanthomonas euvesicatoria* típus törzs, *Capsicum frutescens*-ből izolálva (D. W. Dye, Jones et al. 2006, DSM 19128, ATCC 11633, NCPPB 2968).
- *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, paprikában ETI-t okozó növénypatogén törzs, mely lumineszkál a mesterségesen beépített luxCDABE operon (Fan et al. 2007) miatt.
- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* kórokozó hrcC mutánsa, mely effektorok növénybe juttatására képtelen, ezért apatogén. PTI indukálására használtuk.
- *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, dohány (*Nicotiana*) kórokozó
- *Pseudomonas fluorescens*, szaprofiton, plazmid segítségével lumineszkáló törzse

Standard kezelés:

Az általánosan alkalmazott kezelés a következő volt: Steril csapvízben szuszpendált XEU sejteket injektáltuk XS és GDS növények leveleibe (sejtközötti járatokba), injekciós tűvel. A mintavétel 0, 6 és 24 óra elteltével ("órában") történt. A leveleket csapvízzel leöblítettük. Ezt a 6 kezelést 3 biológiai ismétlésben hajtottuk végre.

Standard környezet:

A növényeket üvegházban neveltük fel virágzásig, majd a baktériumos kezelések előtt 1-2 nappal 25 °C, 80% páratartalomra beállított nevelő kamrákba helyeztük, 16 órás megvilágításban. A baktériumokat rövid távon YDC tápagon ill. nutrient tápagon tartottuk fenn, időnként XS növényben is passzálva-felújítva. Hosszú távon mélyfagyasztást alkalmaztunk.

# Tünettan

## Bevezetés

A tünetek a növény-mikroba kapcsolat érzékelhető, normálistól eltérő külső megnyilvánulásai. Rendszeres megfigyelésük alapvető a növény-nemesítői szelekciós munkában, és sokrétű következtetések vonhatók le belső élettani folyamatokra, melyek hipotézisként szolgálhatnak további élettani és molekuláris vizsgálatokhoz. A levélfoltosság tünetei széles körben ismertek. A GDS tüneteit nemesítői leírták (Szarka and Csilléry 1995, Csillery et al. 2004), és a szövet elhalás hiányáról, enyhe klorózisról és későbbi sejtosztódásról-sejtnövekedésről számolnak be, mely szövet vastagodással (2-3 szoros) és "tömörödéssel", a "sejtközötti járatok megszűnésével" jár. A szövet megtartása nyilvánvalóan előnyös termék eladhatósági szempontból. Laboratóriumi, ellenőrzött körülmények között saját megfigyeléseket is végezhetünk. Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy a növényi vonalak habitusa eleve kissé különbözik egymástól, vonatkozik ez pl. a levelek állására, nagyságára, finomszerkezetére, a gyümölcs színére.

A PTI-t a közeli rokon dohány növényekben a HR tüneteinek elmaradásával szoktuk rutinszerűen kimutatni. Lényege, hogy az ETI-t okozó avirulens kórokozó, a már kialakult PTI miatt nem tud HR-t okozni. Ezt a kimutatást paprikában is meg kellett oldani, hogy a GDS-t és PTI-t egyszerre, egy helyen láthassuk.

## Módszerek

A fertőzést/injektálást ld. a Kezelések c. részben, de a XEU-t mellett az autentikus amerikai törzset is használtuk különböző sűrűségű szuszpenzióban, "dózisban". "Mintavétel" helyett csak megfigyeltük/fényképeztük a növényeket. A növényeket (GDS, Bs2, XS) rövid táv (kb. 1-2 hét) esetében standard környezetben (ld. Kezelések c. részt), hosszabb távú megfigyelésekhez üvegházban helyeztük el.

A tünetek összetettek, ezért megpróbáltuk elemeikre bontani őket, vizuális megfigyelés, tapintás, fényképezés segítségével. Vizsgáltuk a fiziológiai életkor, a fertőző baktérium aktivitása (élő vagy elölt), típusa, és mennyisége (dózis) hatását.

Esetenként a Xanthomonas fertőzés előtt előkezeléseket is végeztünk: különböző számú órával a fertőzés előtt hővel elölt (70 °C, 13 percig) vagy patogenitás-mutáns (P. s. pv. syringae hrcC mutáns) baktériumokat fecskendezve a GDS növényekbe. Ezzel a célunk a PTI mesterséges felerősítése volt.

## Eredmények

### *XS - érzékeny növény:*

A betegség tüneteket 4 altünetre osztottuk, melyek eltérő arányban, de az érett tünetekben együtt láthatók: zsírfolt, fakulás, hipertrófia és sárgulás a léziók még élő, külső részén, elhalás pedig középről kifelé terjedően. Hővel elölt baktériumokkal való oltás tünetmentes maradt, még fakulást sem okozott.

Zsírfoltosodás (átitatottság).

Fiatalabb leveleken a baktériumokat tartalmazó részen az erek mentén, idősebbeken az erek között elszórtan zsírszerűen átitatott sávok, foltok jelennek meg. Ráeső fényben sötétebbek, áteső fényben világosabbak a levéllemeznél. A sávok magasabb (1e8 sejt/ml), a 2-300 um-es foltok pedig alacsony (1e5, 1e4 sejt/ml) inokulum dózissal hívhatók elő. Ez a tünet hosszan fenn tud maradni, köszönhetően a fiatal leveleknek ill. alacsony dózisé inokulumnak.

Fakulás és későbbi sárgulás.

Magas inokulum dózissal ez a leggyorsabban kialakuló tünet (2-3 nap). A fakulás inkább a fiatalabb, a sárgulás inkább az öregedésre hajlamosabb leveleken látható. A sárgulás szisztemikusan is létrejön. A sárgulás mértéke, ha elég magas (1e8 sejt/ml) volt az inokulum dózis, nagyobb a baktériumok által elfoglalt területen kívül, mint belül, ezáltal az injektált régiók zöldebbek a külső szövetnél. A növény a nagy területen sárguló levelet ledobja.

Elhalás.

Magas dózisznál a nekrozis is gyors lehet (3 nap). Barnás színt vesz fel, ami elsősorban az apró erek barnult elhalásának köszönhető. Alacsonyabb dózisznál az elhalás mind a zsírfoltosságot, mind a szisztemizáló sárgulást is követi. A későbbi elhalás sötétebb barnuláshoz vezet. Mechanikai sérülések gyorsítólag hatnak.

Proliferáció, hipertrófia.

A szivacsos alapszövet burjánzása későbbi jelenség, legfeltűnőbb alacsony dózisznál ( $1e3-1e4$  sejt/ml): a zsírfoltokkal együtt, apró pustula-szerű kiemelkedések alakulnak ki a fonák irányában. Magas dózisznál a nekrozis akadályozhatja, ezért az inokulált terület határán érdemes keresni. A szakirodalom (Kay et al. 2007) egy bakteriális effektor fehérje, az AvrBs3 aktivitásához köti.

Az autentikus amerikai törzs nagy dózisban gyorsabban és harsányabb tüneteket provokált, mint a magyar (XEU). Részletesebb megfigyelésekhez a magyar törzset választottuk, ld. Sejtszámlálás c. fejezetet.

### *GDS - rezisztens növény*

Magas dózisznál valamennyi, az érzékeny növényre jellemző altünet típust megfigyelhettük, mégis, az összkép nagyon eltérő, egyszerűbb: többnyire csak különböző mértékű fakulás. Hővel előlt baktériumokkal csak gyenge fakulás (de semmilyen más altünet nem) idézhető elő.

Zsírfoltosodás (átitatottság).

Nem jellemző (esetleg a nagyon fiatal, fejletlen levelekben látható csak, az erek mentén).

Fakulás és későbbi sárgulás.

A fakulás tipikusan intenzívebb, mint az érzékeny növényben. A sárgulás ritka, mert nagyon lassan következik be. A leghosszabban megfigyelhető és legfeltűnőbb tünet ezért fakó folt a levél lemezen. Ha a fertőzés viszonylag nagy területet érint és/vagy nagyon magas dózisu, a sárgulás szisztemikusan jelentkezik, hasonlóan az érzékeny tünethez, és e levelek hamar (10 nap után) leesnek.

Elhalás.

Megtörténik, de az érzékenyhez kapcsolathoz képest jelentősen késleltetve, akár 1-2 hónappal a fertőzés után. Viszonylag hamar (kb. 2 hét után) bekövetkezhet fiatal növények idősebb levelein, sárgulást követően.

Proliferáció, hipertrófia.

A GDS tipikus megnyilvánulása. Fiatal leveleken tapasztalható, magas dózisznál, már 4-5 nap elteltével.

### *PTI*

Csak 24 órás előkezelés után tapasztaltuk a HR elmaradását, rövidebb előkezelésnél nem.

### *Megvitatás*

A GDS tünetei nagyon eltérnek a betegségtől, mégis, elemeiben hasonlóak. Elsősorban a hipertrófia általános jelenléte arra enged következtetni, hogy a PTI nem képes egyes bakteriális effektorok bejutását ill. működését meggátolni. Ez az eredeti "GDS mint erős PTI" hipotézis ellen szól.

Az érzékeny (XS) növényben látványos az öregedés serkentése a baktérium által közvetlenül elfoglalt területen kívül. Ez GDS esetében sokkal gyengébb. Kínálkozik a hipotézis, hogy a baktériumok az öregedés forrás - felhasználó szövetek közötti szállítási folyamatainak kiaknázásával juthatnak tápanyagokhoz és/vagy más előnyökhöz. A GDS hatékonyan gátolja, lassítja a nekrozist. Ez küllemileg, gazdaságilag előnyös, azonban a sejthalál szolgálhatja a növényi betegség ellenállóságot, pl. a hiperszenzitív reakció keretei között.

Molekuláris elemzéseinkhez (transzkriptomika, proteomika) a mintákat jóval az e fejezetben leírt tünetek bármelyikének megjelenése előtt vettük. Ezekhez az elemzésekhez fontosabbnak tartottuk azt a korai időszakot

elemezni, amikor az ellenállóság, a baktérium gátló mechanizmus kialakul, mint a késeit, mikor jól látható, de talán már csak következmény-folyamatok zajlanak.

A 24 órás előkezelés igény a PTI kimutatásához meglepetés volt, hiszen dohányban akár 2-3 óra is elég. Elvben a PTI az elsőként kifejlődő immun mechanizmus, mert bármely baktériummal való találkozásakor már minden adott: ligand (MAMP), annak növényi receptora és a kapcsolt 'downstream' elemek. Esetünkben talán a PTI kimutatási módszer volt viszonylag érzéketlen. A biztonság kedvéért megtartottuk a 24 órás időhözagot a két inokulálás között.

## Sejtszámlálás

### Bevezetés

A betegség ellenállóság talán legfőbb ismérve, hogy visszaszorítja a fertőző szervezetet. Ennek a hatásnak a mértéke, tartama, kifutása kritikusan fontos a kórokozó túlélése szempontjából. Érdekes módon nem találtunk adatokat a GDS baktérium-gátló hatásáról. Ezeket tehát pótolnunk kellett. Figyelembe vettük, hogy a baktériumok fertőző adagja a természetben igen széles tartományban változhat, de legjellemzőbb az alacsony fertőző sejtsűrűség. Molekuláris kutatásaink miatt, hogy a növényekből jól mérhető válaszokat kapjunk, azonban magasabb inokulum dózissal (1e8 sejt/ml) is számoltunk. Összehasonlítottuk a magyar és az autentikus *X. euvesicatoria* amerikai törzset, hogy a megfelelőbbet választhassuk ki a molekuláris kísérletekhez.

### Módszerek

A baktériumok injektálása és a növények további tartása a Kezelések c. fejezetben leírtak szerint történt, de az autentikus *X. euvesicatoria*, *P. s. pv. maculicola* és *P. fluorescens* törzsekkel is dolgoztunk. Az inokulum dózisek 1e4, 1e5, 1e6, 1e7 és 1e8 sejt/ml voltak, a lumineszcens törzseknél 1e8 sejt/ml.

A standard időpontokon kívül több más időben is vettünk mintát: *Xanthomonas* esetében 10mm-es dugófúróval 3 levélkorongot vágunk, ezeket Eppendorf csőben, őrlőpálcikával, kevés apró szemű steril homok és 250 ul foszfát-puffer (10mM, pH 7.0) jelenlétében finomra őröltük. Ezután ebben a pufferben hígítási sort készítettünk, ahonnan az egyes hígításokból 10-10ul-t cseppentettünk Nutrient tápagra. 36-48 óra elteltével sztereomikroszkóp alatt számoltuk meg a kinőtt telepeket. A *P. s. pv. maculicola* és *P. fluorescens* lumineszcens törzseknél a levélkorongok fénykibocsátását luminométerben mértük. Ez a módszer a kitenyésztésnél gyorsabb és egyszerűbb.

A PTI-t 24 órával korábbi előkezeléssel indukáltuk, ld. Tünettan c. fejezetet, GDS növényekben: "GDS+PTI".

A magyar kórokozó törzs azonosítását PCR módszerrel, a (Araújo et al. 2012) szerint végeztük.

### Eredmények

A magyar izolátum (XEU) használata előtt megbizonyosodtunk taxonómiai hovatartozásáról.

Kezdetként megállapíthattuk, hogy a GDS gátolja a XEU elszaporodását 2-4 napos intervallumban, közepes (1e6-1e7 sejt/ml) inokulum szintből kiindulva. Sőt, a GDS még a hiperszenzitív reakciónál (Bs2 gént tartalmazó növényekben) is jobb eredményeket adott, kb. 1 nagyságrenddel. A 4. napon a GDS és érzékeny növényekből kapott értékek között 4 nagyságrend is volt. 1e8 sejt/ml dózisonál a GDS 6 órában még alig, de 24 órában már hatott (gátolt). A PTI előkezelés (GDS+PTI) 6 és 24 órában is igen hatásosan gátolta kórokozó populáció növekedését, de egyúttal a GDS hatása is látszott, tehát a GDS és PTI additív gátló hatást mutattak.

A *P. s. pv. maculicola* hasonlóan lumineszkált GDS és Bs2 növényekben, ahol a jel nőtt 20 óráig de XS növényekben ez a növekedés nem volt meg. GDS növényekben az előkezelés negatív hatása itt is mérhető volt, jellemzően fiatalabb levelekben. *P. fluorescens*-re hasonlóan világított mindhárom paprika vonalban.

A baktériumok legalább 1 héten keresztül szaporodtak érzékeny növényben: a szaporodás tartománya relatíve szűkebb volt nagyobb kezdeti inokulummal (kb. 8-10 osztódás), mint alacsonnyal (14-15 osztódás). Magasabb dózissal viszont a baktérium nagyobb abszolút sűrűséget (kb.  $1 \times 10^9$  sejt/cm<sup>2</sup> levél) ért el, mint alacsonyból indulva (kb.  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  sejt/cm<sup>2</sup> levél). Két hét után a baktérium szám csökkent, de a telepek ekkor már csak az alacsony ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  sejt/ml) dózissal kezelt levelekből voltak számolhatók.

A GDS-ben is szaporodtak a baktériumok, de az érzékeny levelekhez képest kisebb ütemben. sőt, alacsony inokulumnál két nap után számuk abszolút értékben csökkenni kezdett, így tehát a legnagyobb különbségeket GDS és érzékeny növények baktérium populációi között a  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  inokulum tartományban és kb. 1 hét után mértük, ami kb. 12 osztódásnyi (vagyis kb. 4000-szeres).

Az egy hónapon túli megfigyelések (jellemzően a GDS növényből, mivel az érzékeny a fertőzött leveleit korábban eldobja) a baktérium jelenlétét mutatták, átlagosan  $1$ - $1.5 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> között, alacsony inokulum dózissal.

Esősorban az alacsonyabb inokulumok esetében az amerikai törzs szaporodó képessége elmaradt a XEU-étől,  $1 \times 10^6$  dózissal inkább csak a GDS-ben, kisebb dózissal pedig már az XS-ben is. Egy hónapon túl, viszonylag alacsony (kb.  $1 \times 10^3$  sejt/ml) számban, általában jelen volt mind érzékeny, mind a GDS növényben.

## Megvitatás

A GDS "igazi", baktérium gátló rezisztencia, és ebben, legalábbis rövidtávon, a Bs2 rezisztencia gén hatását is felülmúlja. A GDS indukált voltát jelzi, hogy e hatás kifejeződéséhez kb. 6-18 óra szükséges. A GDS mechanizmusa eltér a PTI-étől, mivel a kettő hatása összeadódik.

A GDS kiváltóit, esetleges elicitor(ai)t nem ismerjük, bár fontos lenne tudni. Ezzel kapcsolatban jegyezzük meg, hogy cseh kutatókkal közösen áttekintettük az olyan biológiai eredetű ismert anyagokat, melyek "valódi", valamilyen kórokozó tényleges visszaszorulásával járó rezisztenciát idéznek elő növényekben. Baktériumokból pl. igen széles a kémiai és funkcionális paletta (\*Burketova et al. 2005).

A GDS hatását csak a Xanthomonas törzsekkel szemben tapasztaltuk, míg a PTI-ét Pseudomonas-szal szemben is. Ez a gds R-gén jellegére utal. A GDS hatékonysága véges, kimerül nagyszámú virulens kórokozó jelenlétében. A GDS növényekben egyensúly alakul ki a baktérium gátlás, annak indukciója ill. a virulencia folyamatok között, melynek eredményeképpen akár nem jelentéktelen számú baktérium maradhat sokáig életben a GDS növényekben. Ezek a szövetrészek nem halnak el, ezért toleranciáról beszélhetünk.

Az érzékeny növény által biztosított feltételek korlátozottak nagyobb számú baktérium osztódásának fenntartásához.

A magyar izolátumot választottuk tesztorganizmusnak molekuláris munkákhoz, mert jobban osztódott a mi paprika vonalainkban, ami miatt a GDS hatása - mindent összevetve - erősebbnek mutatkozott.

## Transzkriptomika

### Kiválasztott bakteriális gének aktivitás mérése (qPCR)

#### Bevezetés

A növényi rezisztencia becsléshez standard módon használt baktérium sejtszámlálás vizsgálat (ld. Sejtszámlálás részt) csak a legfittebb, az izolálással járó stresszeke túlélő, majd méretes telepeket képezni tudó baktériumok sejteket mutatja. A GDS a hatását, a telep regenerációs képességen túl, ill. ettől függetlenül, más fontos élettani tulajdonságra is kiterjesztheti. Ilyen fontos tulajdonság a kórokozó képesség, a virulencia. A kórokozó képesség egyértelműen függ pl. a hrp gének kifejeződésétől, tehát ezen gének aktivitása tájékoztathat minket arról, hogy a baktérium fertőzőképessége - legalábbis e specifikus gének mint feltétel alapján - éppen milyen szinten van. A PTI-ről pl. ismert, hogy gátolja a hrp gének kifejeződését (Bozsó et al. 1999). Más gének általánosan jelezhetnek egy éppen végbemenő stressz folyamatot, amit pl. a gazdanövény is okozhat. E szempontok alapján választottunk ki kb. 20 bakteriális gént, melyeknek kifejeződését vizsgáltuk a standard GDS-XS-idősor rendszerünkben. Ezek közül a

következőket tárgyaljuk: T3SS szerkezeti gének (hrcC, hrcU, hrpE, hrpF); effektor gén (AvrBs3-szerű); T3SS vezérlő gének (rpfC, rpfG, clp, hrpG, hrpX); Stressz válasz gének (dpsA, proP, proWX, betT).

## Módszerek

A kezeléseket (XEU baktérium GDS, XS és Bs2 növényekben, valamint PTI-előkezelt GDS növényben, 3 időpontban) a Kezelések és Tünettan c. fejezetben leírtak szerint végeztük, egységesen egyféle, 1e8 sejt/ml sűrűségű sejt szuszpenzióval fertőzve.

Mintavételkor a levelekből korongokat vágunk, majd folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk és -80 °C-n tároltuk. A korongokat hűtött mozsárban finomra őröltük, és kivonó kitékkel (RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit (QIAGEN) ill. Total Plant RNA Mini Kit (GeneAid)) az RNS-t izoláltuk. A kivont minták nukleinsav (DNS-RNS) tartalmát NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) készülékkel meghatároztuk. Az RNS-t megtisztítottuk a DNS-től DNáz (TurboDNase kit) kezeléssel, kiindulási koncentrációnak 80 ng/μl-t állítottunk be. A tisztított RNS-ből cDNS-t készítettünk High Capacity cDNA Reverse Transcription kittel (Applied Biosystems).

A kvantitatív PCR-hez a BioLine SensiFast SYBR No-ROX kitet használtunk. A reakcióelegy a következő volt: 2,5 μl templát; 1,5 μl primer pár; 7,5 μl mastermix; 3,5 μl H<sub>2</sub>O. A PCR gépben (MJ Research DNA Engine Opticon 2) a Biorline kitéhez tartozó hőprogramot használtuk, illetve olvadási görbéket is mértünk. A lefuttatott program végén az olvadási görbék és ciklusszámok kiértékelésével, kétséges esetekben agaróz gélben való futtatással ellenőriztük a PCR jóságát. Több referencia gén kipróbálása után 4 gén maradt, melyeket a célgénnel párhuzamosan mértünk, hogy a végső adatok a mikrotiter lemezek között is összehasonlíthatók legyenek. A PCR primereket Primer3 4.0 és Oligo 6.31 szoftverekkel terveztük, a Xanthomonas campestris pv. vesicatoria teljes genomi szekvenciáját, GenBank AM039952.1., alapul véve.

A génkifejeződés nyers adataiból adatbázis készült (MySQL, Oracle), és Python szkriptek segítségével elemeztük.

## Eredmények

T3SS szerkezeti gének expressziója:

A szerkezeti, hrp pílust (T3SS) alkotó gének egységesen viselkedtek a kezeléseknél kialakult növényi környezetben:

- nem mutattak expressziót az injektálás előtt;
- korai és gyors indukció bármely növényben (XS, GDS, előkezelt "PTI+GDS");
- az XS (érzékeny) levéllel összehasonlítva, alacsonyabb kifejeződési szint PTI+GDS, és magasabb szint GDS esetén.
- A Bs2 növényekhez képest, a GDS növényekben magasabb szintű génexpresszió.
- A T3SS legnagyobb mennyiségben igényelt elemét, a HrpE fehérjét kódoló gén aktivitása kiugrott a többi struktúrgéné közül.

Effektor (AvrBs3-szerű) gén expressziója:

GDS növényekben a szintén megemelkedett - az érzékenyhez növényhez képest- az olyan effektor gén(ek) aktivitása, melyeknek konzervált szekvencia szakaszához terveztünk PCR primereket. Ez utóbbiaknál azonban már a nitrogénben gazdag táptalajban és mértünk némi kifejeződést, hasonlóan a hrpG-hez (ld. alább).

T3SS-t szabályozó gének expressziója:

Azt találtuk, hogy a külső környezeti szabályozás két génjének (hrpG, hrpX) aktivitása jellegzetesebben reagált kezeléseinkre, mint a belső szabályozás (rpfC, rpfG, clp) génjei. Mind a hrpG, mind a hrpX alacsony alapszinttel bírt táptalajon, és a növényben nagymértékben indukálódott. Az XS növényhez, mint kontrollhoz viszonyítva:

- a GDS növényekben magasabb volt a hrpG kifejeződése, míg a PTI indukciója alig befolyásolta a hrpG kifejeződését;
- a GDS növényekben viszont nem változott a hrpX expressziója, míg a PTI indukált növényekben alacsonyabb volt. A Bs2-höz viszonyítva, a GDS növényekben némileg magasabb volt a hrpG és hrpX szintje, de csak 24 órával a fertőzés után. Ugyanakkor az rpfC és clp kifejeződése a Bs2 növényekben volt magasabb.

Néhány stressz válasz gén expressziója:



A *dpsA* kifejeződése követte a baktérium *in planta* növekedésének irányát - fordított előjellel. Szintje GDS és Bs2 növényekben is emelkedett, de Bs2-ben korábban és nagyobb mértékben. Ugyanakkor nem tudtuk szárazság stresszel összefüggésbe hozható gének aktivitás változását kimutatni.

A fenti eredmények egy részét a \*Krüzselyi et al. (2016a) közölte.

## Megvitatás

A PTI gátolta, a GDS ezzel ellentétben, inkább serkentette a *hrp* struktúrgének aktivitását. A GDS egy másik rezisztencia mechanizmus, a Bs2 által félmjelzett ETI-hez képest is magasabb *hrp* struktúrgén aktivitással járt. Mint ismeretes, e gének által kódolt fehérjék szükséges feltételei a patogenitásnak és virulenciának. Csupán ezt nézve arra juthatunk, hogy a PTI és GDS eltérő antibakteriális mechanizmust definiál. A *hrp* gén kifejeződés stimulálása látszólag ellentmond annak, hogy itt rezisztencia működik, de amennyiben avirulenciának összhangban kell lennie a sejt egyéb funkcióival, egy kis zavar is felboríthatja a baktériumsejt egyensúlyát. Egyszerűbb magyarázat az, hogy a GDS nem a patogenitási géneken keresztül hat. Ez összhangban lenne azzal, hogy a GDS-t valamely effektor váltja ki. A T3SS-t irányító különböző fehérjék génjei már jóval heterogénebben viselkedtek. Ismert, hogy a HrpG-HrpX szignál tengely elsősorban külső, tehát *pl.* növényi, környezet által meghatározott a rokon faj *Xanthomonas campestris*-ben. A kódoló két gén aktivitása összhangban van az általuk irányított struktúrgénekével, tehát a kezeléseink megfigyelt hatása, legalábbis részben, a HrpG-HrpX tengelyen keresztül érvényesülhet.

A belső környezethez (*pl.* kvórum érzékelés, ciklikus diGMP szintje) köthető *hrp* regulátorok - RpfC, RpfG és Clp - génjeinek viselkedése már nem értelmezhető ennyire közvetlenül, de ez nem meglepő, hiszen a belső milió a külsőnél sokkal kiegyensúlyozottabb, sokkal több hatást tükröző rendszer. Az említett struktúrgénekén kívül, a GDS és Bs2 hatása itt eltért.

Vízhiányra, mint az apoplaszt által közvetített lehetséges stresszre, nem tudunk következtetni, más stresszre viszont igen. A *hrp* génektől látszólag függetlenül, részben talán az oxidatív stressz hatást kiegyenlítő, mozgott a *dpsA* aktivitása, ami egy DNS-hez kötődő, oxidatív stresszre felelő fehérje. A *dpsA* kifejeződés minimuma kijelölte a stressztől legmentesebb kezelést, ami - nem meglepően - az XS növény, 24 órában. Másrészt, e gén aktívabb volt a GDS növényekhez képest a Bs2-t hordozó növényekben. Az ETI és az oxidatív robbanás kapcsolata ismert, tehát valószínű, hogy a GDS környezetben alacsonyabb ill. a baktérium által sikeresebben orvosolt oxidatív stresszről beszélhetünk.

Következtetésünk szerint a vizsgált génaktivitások alapján a GDS közelebb áll a Bs2-höz, mint a PTI-hoz. Világos, hogy ezek az adatok túl szűkkörűek a baktérium gátló mechanizmus közelebbi meghatározásához. Ezért kezdeményeztünk egy második mélyszekvenálási vizsgálatot, ahol beleláthatunk bakteriális gének széles körének kifejeződésébe (ld. RNS szekvenálás c. fejezetet).

## RNS szekvenálás

### Bevezetés

Az RNS szekvenálás a projekt vizsgálati módszerei közül a leggazdagabb információban, mivel a legkevésbé diszkriminatív, rálát a teljes transzkripció aktivitására. Ennek az az előnye, hogy korábban nem sejtett összefüggések kerülhetnek felszínre. Hátránya, hogy magasfokú informatikai felkészültséget igényel.

A projekt tervezésekor az RNS szekvenálás még nem jöhetett szóba, drágasága miatt. Egy belgiumi workshopon való részvétel elnyerésével azonban előállt a lehetőség, amit meg kellett ragadni.

### Módszerek

A standard kezeléseket végeztük el: fertőzés XEU 1e8 sejt/ml dóziséval, GDS és XS növényekben, mintavétel 0, 6 és 24 órával fertőzés után, 3 biológiai ismétlésben (ld. Kezelések c. rész). Kb. 100 mg levélszövetből vontuk ki az RNS-t RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) segítségével, minőségét és mennyiségét ellenőriztük, majd elküldtük a szekvenáló

laborba (GATC Biotech, Konstanz, Németország), ahol a paprika mRNS-ből Illumina HiSeq 2000 technológiával készült mind 'paired-end', mind 'single-read' típusú leolvasás, mintegy 40 GB fastq fájlba írva. A nagy adathalmazok feldolgozását a VIB-UGent Center for Plant Systems Biology (Gent, Belgium) segítségével végeztük. Röviden: a nyers read-eket minőségi kontroll (FastQC), szűrés-trimmelés (FastX) után az akkor rendelkezésre álló paprika transzkriptom gyűjteményhez (Ashrafi et al. 2012) illesztettük (GSNAP), amit e génkészlet egyes génjeihez való mennyiségi rendelése (samtools idxstats) követett. Minták szerinti kvantifikálás, majd normalizálás következett R környezetben, EdgeR csomag használatával. Egyéni adatbázist építettünk (MySQL), mely később befogadhatta a más információ forrásból származó kapcsolódó adatokat, mint pl. Trapid (Van Bel et al. 2013), mely statisztikát és funkcionális hozzárendelést végzett, valamint a paprika rokon növényeket jobban reprezentáló MapMan (Forschungszentrum Jülich GmbH). A kategorizálást és kapcsolódó grafikus elemzést a Python MySQLdb API, Numpy és Matplotlib csomagjaival hajtottuk végre.

## Eredmények

Az összesen mintegy 162.4 millió olvasat ('read') egy 31996 x 18-as táblázatban (a Sanger készlet (Ashrafi et al. 2012) génjeinek száma x a minták száma), oszlott el. Az átlagos génkifejeződés XS növényekben általában magasabb volt, mint GDS növényekben. A XEU fertőzés mindkét növényben a gének többsége aktivitásának fokozatos csökkenését okozta. Megadott mennyiségi jellemzők mellett (kifejeződés-különbség ráta legalább 2-szeres, 'False Discovery Rate' nagyobb, mint 0.05) meghatároztuk, mely gének fejeződnek ki differenciáltan, eltérően, az egyes kezelések között, azok páronkénti összehasonlítása során. A 15 lehetséges kezelés párt összesítve 8906 (28%) ilyen gént (DE-gén) kaptunk. A továbbiakban e DE-génekről lesz szó.

A DE géneknek mintegy 76-81%-a csak az egyik (6 vagy 24 órával fertőzés után) időpontban változott, a maradék mindkét időpontban: ezek túlnyomó része 6 órával a fertőzés után visszaállt az eredeti állapot közelébe.

A GDS és XS vonalak 756 gén (2.43%) aktivitásában különböztek már a fertőzés pillanatában is (0. óra), A 756 DE gén 2/3-a az XS-ben volt aktívabb.

6 órával a fertőzés után ez a különbség 2606-ra nőtt, és majdnem négyszer annyi gén mozgósult a GDS-ben (3843), mint XS-ben (1008). Ekkor a közösen (GDS- és XS-ben is) változó gének aktivitásának nagy többsége ugyanolyan irányban változott, de a GDS-ben nagyobb mértékben, mint az XS-ben. A 0. órában említett, XS-ben magasabb szinten átíródó gének 2/3-a 6 óra után is megtartotta ezt a pozícióját.

6 és 24 óra között már az XS-ben volt nagyobb arányú változás (2466) a GDS-hez képest (1859). A két növényben a korreláció ekkorra megszűnt a közösen változó gének aktivitás irányát tekintve, a DE gének száma 24 órával a fertőzés után 4691-re nőtt.

0-24 óra távlatában elmondható, hogy GDS növények transzkriptomja sokkal jobban változott, mint az XS-é, s hogy a mindkét növényben változó gének kb. fele eltérő irányt vett, másik felének 83%-a pedig a közösen csökkenő aktivitású DE gének.

Elsősorban a gének funkcióit szándékoztuk meghatározni, melyet alapul véve a későbbi kutatási lépések tervezhetők. Hasonló géneket kerestük a PLAZA2.5 növényi adatbázisban TRAPID és Mapman eszközök segítségével, melyek homológia alapján a paprika génekhez ontológiai (GO) és fehérje domén (INTERPRO) funkcionális kategóriákat rendelnek. A génekhez rendelhető kategóriákat rangsoroltuk (TRAPID), viszonylagos feldúsulásuk ('enrichment') szerint. Így 443 GO és 163 INTERPRO kategóriára szűkült a mennyiségileg legjelentősebb funkciók köre. A GO kategóriák bonyolult alá- és fölérendeltségi kapcsolatai miatt az adatok ábrázolását tovább egyszerűsítettük REVIGO eszközzel. Eszerint a GDS és XS vonalak között a legfontosabb különbségek olyan biológiai folyamatokban vannak, mint a biotikus stressz válaszok, kromatin szerkezet, oxidáció-redukció (elektron szállítás, fotoszintézis) és szénhidrát metabolizmus, melyek elsősorban a sejtmagban, színtestekben és sejtfalban mennek végbe.

## Megvitatás

A 756 DE gén különbség 0. órában nem meglepő, tekintve a genetikai különbséget a két vonal között. A GDS és XS növények több külsődleges jellemzőben is eltérnek, legfeltűnőbb a gyümölcs színe. A gds rezisztencia génen kívüli

genetikai különbségeket célszerű lett volna a növényekből keresztezésekkel eltüntetni, de ez idő és kapacitás hiány miatt nem történt meg. A rezisztenciára jellemző hatás azonban, mintegy kigyűjtve, tetten érhető a baktérium reakcióin, elváltozásain: és ez volt az egyik oka annak, hogy a folytatásban igyekeztünk a patogént egyre inkább előtérbe helyezni. A másik ok az, hogy a kórokozó oldala sokkal kevésbé ismert. Ezért a projekt végén pedig olyan RNS szekvenálás kísérletbe kezdtünk, melyben a kórokozó RNS-eit megpróbáltuk értékelhető mértékben feldúsítani, ún. duál szekvenálást megvalósítva. Ez a munka jelenleg még folyamatban van.

Általában a fertőzés inkább gátolta, mint stimulálta a génátírást. Ez a jelenség kapcsolatban lehet azzal a gyakori megfigyeléssel, hogy a növény-mikroba kölcsönhatások során az erőforrások felhasználása átcsoportosul a növekedés-egyedfejlődésről speciálisabb területekre, mint pl. másodlagos anyagcsere stb.

A fertőzés korai időszakában a két növény hasonlóan reagált, de a GDS válasza felülmúlta az érzékeny növényét, bővebb és erősebb volt. Ismeretes, hogy az érzékeny növény anyagcsereje felett a virulens baktérium effektorai részben átveszik az irányítást, s hemibiotrókhoz illően, elnyomják a védekező reakciókat, hogy viszonylag háborítatlanul szaporodhassanak. A rezisztens növényben az észrevétlenség stratégiája nem működik. Ennek az elvnek itt szép példáját láthattuk a DE gének számának dinamikájában.

A közeli rokon dohányban, a PTI és ETI transzkriptom összevetésénél szintén nagyfokú átlapolódást találtunk 6 órában (\*Bozsó et al. 2016), s ezek az adatok felhasználhatók a PTI - GDS rezisztenciák összevetésében paprikában. Sőt, ezek a dohányos kísérletek farmakológiai módszerek segítségével rámutattak egyes, pl. foszfolipázokat szerepeltető jelátviteli utakra a PTI-ben, és több, paprikában is tesztelhető jelátviteli útra, melyet a virulens kórokozó manipulál a gazdanövényben.

A korai időszakban említett átfedés a GDS és XS transzkriptomja között később nagyon lecsökkent, tehát a fertőzésre adott kétféle válasz tartalmilag vagy minőségileg egyre távolodott egymástól. Mindez amellettt történt, hogy 24 órára sok (6-700) gén visszaállt az eredeti állapotba mindkét növényben.

Az ismertetett trendekben szereplő géncsoportok tartalmát megismerve géncsendesítési kísérletekbe kezdtünk (ld. DE gének csendesítése c. fejezetet), mely részben arra is alkalmas, hogy qPCR segítségével igazolja az RNS szekvenálás eredményeit.

## DE gének csendesítése

### Bevezetés

az RNS szekvenálás egyik fontos célja a kezelések során különböző mértékben kifejeződő (DE) gének kijelölése. Ezek a gének feltehetően részt vesznek a növényi védekezési válaszok kialakításában és/vagy befolyásolásában a GDS és a fogékony (XS) növényekben. A géncsendesítés kézenfekvő módja egy-egy gén szerepe kiderítésének. Az RNS szekvenálás funkcionális folytatásaként ezért vírus-indukálta géncsendesítési kísérleteket (VIGS) végeztünk. Célunk az volt, hogy több információt kaphassunk néhány olyan DE génről, melyek kitértek a kezelések közötti expressziós különbség nagysága alapján.

### Módszerek

Először ellenőriztük a kiválasztott gének kifejeződésének eltérését kvantitatív RT-PCR-el, majd 250-450 bp cDNS szakaszokat klónoztunk a TRV (Tobacco Rattle Virus) vektorba. A cDNS szakaszoknak géncsendesítés célú specifitását is ellenőriztük (VIGS tool, Sol Genomics Network). Arra törekedtünk, hogy a lehető legkevesebb nem célirányos géncsendesítés történjen, ill. hogy ezek a géndarabok *Nicotiana benthamiana*-ban is működjenek (a Solanaceae család génjei közötti nagy hasonlóság ezt lehetővé teszi). A *N. benthamiana* bevonása azért volt fontos, mert egyrészt ez a növény a Solanaceae család modell növénye, másrészt a géncsendesítés nagy hatékonysággal és biztonsággal működik benne. Mivel korábban laboratóriumunkban nem folyt paprika géncsendesítési kísérletek, ezért előkísérleteket végeztünk a hatékonyságának növelése érdekében. Többféle fertőzési módszert, vírus vektort és környezeti paramétert is kipróbáltunk.

Kilenc géncsendesítési konstrukciót készítettünk és teszteltünk. Az ezekkel csendesíteni kívánt gének a növényi válaszok különböző folyamatait érintik: pl. szalicilsav anyagcsere, terpén szintézis, glikolízis, jelátvitel (sejtfelületi szignál fehérje), protein lebontás (cisztein proteáz), sejtfal szerkezet (cisztein-gazdag fehérje).

A géncsendesítés védekezésre gyakorolt hatására a kompatibilis kórokozók szaporodásának mérésével következtettünk (módszert ld. Sejtszámlálás c. fejezetben). A *N. benthamiana* esetén a baktérium a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* volt, paprikában a XEU. A levelekből 3 nappal a fertőzés után vettünk mintát a különböző géncsendesítési konstrukciókat képviselő ill. az üres (géncsendesítési inszertet nem tartalmazó) vektorral kezelt növényekből.

## Eredmények

*N. benthamiana* esetén a géncsendesítés bizonyos gének esetén fenotípusos változást is eredményezett. Így rövidebb szártagokat és sűrűbb elágazásokat lehetett észrevenni a terpén szintézis, és a sejtfelületi szignál fehérje konstrukciók csendesítése esetén. Ugyanakkor ezt a fenotípusos változást nem lehetett a paprika növények esetében megfigyelni. A *N. benthamiana* esetében az ismételt kísérletekben a szalicilsav anyagcserét (a szalicilsav inaktiválását eredményező módosítást) befolyásoló gén csendesítése volt hatással a baktérium sejtszámára, mivel az alacsonyabb értéket ért el a kontrollokhöz képest (kb. 75%-al kevesebb baktérium).

## Megvitatás

A fenotípusos változást eredményezhette a *N. benthamiana*-ban az erősebb géncsendesítés, a hormonháztartás egyensúlyának megbomlása, vagy esetleg a nem kívánatos nem célszekvenciát érintő csendesítési folyamat is. A fenotípus változás jelentőségének esetleges szerepe a védekezési gén funkciójában még feltáratlan és későbbi vizsgálatok vezethetnek válaszhoz.

A szalicilsav esetleges szerepét a GDS és az XS növények közötti különbségek kialakításában korábban mások által elvégzett vizsgálatok is mutatták melyek mennyiségbeli különbségeket mutattak ki. Saját kutatások a PTI-ra nézve a szalicilsav felé vezető fenilpropanoid úti enzimek inaktiválására utalnak, a lignin szintézis génjei viszont aktívak (\*Szatmári et al. 2004). Ez részleges hasonlóság lehet a GDS-sel. Paprika esetében a GDS növényben csendesített cisztein proteáz esetében lehetett kb. 40%-al kevesebb baktériumot detektálni a kontrollhoz képest. A cisztein proteázok a védekezési folyamatok különféle lépéseiben vehetnek részt a jelátviteltől kezdve a kórokozóra történő közvetlen hatásig, melynek pontosítása ugyancsak további kutatási terület lehet.

## Metabolomika - direkt bioautográfia

### Bevezetés

Ez a megközelítés, a genomikai és proteomikai mellett, szintén egy széles bázisú vegyületcsoportból (kismolekulák, főleg elsődleges és másodlagos anyagcsere termékek) indult ki, a csoport tagjainak egy bizonyos tulajdonságát - antibakteriális hatás elsősorban *Xanthomonas euvesicatoria*-val (XEU) szemben - keresve. Ilyen, a baktériumra közvetlenül ható anyag(ok) jelenléte egy rezisztens növényben feltételezhető, és hozzájárulhat a baktérium-ellenes mechanizmusához. Ezért elsősorban a paprika növényben kerestünk ilyen vegyületeket. Az irodalomban szinte csak a gyümölcs kapszaicin anyagának hatásairól van szó, és ismert egy, baktériumokat in vitro gátló, hiperszenzitív reakció során indukált vegyületcsoport (kumaroil-, ill. feruloil-tiramin, Newman et al. (2001)) paprika levélben.

Kutatásainkat kiterjesztettük más növényekre is, hogy a *Xanthomonas* növénypatogénnel szemben eredményesen alkalmazható vegyületekhez jussunk, melyek később potenciális jelöltek lehetnek a növényvédelem szempontjából.

Az új antibakteriális vegyületek keresése növényekből rendkívül fontos az antibiotikum rezisztencia elterjedése miatt, és ez a kutatási irány konkrét anyagokkal szolgálhat a gyakorlati hasznosíthatóság érdekében. Az antibakteriális hatás, általánosabban a biológiai aktivitással rendelkező molekulák minél célravezetőbb, gyorsabb és

olcsóbb meghatározása is célunk volt növényi kivonatokból, amihez megfelelő módszert fejlesztettünk a Biokémiai Csoporttal kialakult kooperációban.

## Módszerek

Kromatográfias eljárás(ok)hoz csatolt mikrobiológiai vizsgálati módszereket alkalmaztunk és számos, ehhez kapcsolható modern technológiát alkalmaztunk (ld. 1. Táblázat), melyeket tovább itt nem részletezünk, csak a paprikára vonatkozó részeket. A paprika vizsgálatokhoz leveleket és gyökereket is bevontunk. Az aktív anyagokat 50%-os etanollal és acetonnal vontuk ki. Más növények esetében illóolajat illetve oldószeres kivonatokat vizsgáltunk. Először az alap-rendszert írjuk le: ez a vékonyréteg kromatográfiához (TLC) csatolt direkt bioautográfia (DB), melyhez az anyagok izolálási-meghatározási folyamatában többször is vissza lehet és kell térni (\*Móricz and Ott 2015). Az extrahált paprika mintákat n-hexán-etil-acetát 30:70 arányú eluenssel futtattuk normál fázisú (szilikagél) TLC lapon. A felbontás minőségét DB vizsgálatokkal igazoltuk. A DB alatt a kifejlesztett TLC lapot baktérium-táplódat szuszpenzióba merítettük, ami lehetővé teszi, hogy az elválasztott komponensek a rétegen in situ gátolják vagy serkentsék a tesztorganizmus növekedését. Az antibakteriális aktivitás kimutatását a baktériumok vitális (életképesség) festésével végeztük XEU és Bacillus esetében, és hűtött digitális kamerával lumineszcens baktériumoknál (*P. s. pv. maculicola*, *A. fischeri*). Az így meghatározott retenciós faktorú aktív foltokkal, az elválasztást és bioaktivitás igazolását követően, derivatizálási (származékképzési) kísérleteket végeztünk. A rétegről való izolálást tisztaság és aktivitás vizsgálatok, majd nagyműszeres analitikai módszerek követték, esetenként standard anyagok szerepeltetése mellett.

## Eredmények

Módszereink hatékonysága terén előrébb kellett jutnunk, ezért több fejlesztést is végeztünk, és ezekhez köthető az eddigi publikációink túlnyomó része. A fejlesztés érdekében is el kellett térni a paprika rendszertől, mivel a paprika igen szegénynek bizonyult baktérium gátló anyag tartalom tekintetében. A saját *Xanthomonas* törzsünk sem volt ideális teszt objektum, és bár megoldottuk bevezetését a TLC-DB rendszerbe (\*Móricz et al. 2015b), ezért mellé további teszt-baktériumokat társítottunk (pl. lumineszcens baktériumok (\*Horváth et al. 2013), melyekkel a módszertani munka megbízhatóbbá és gyorsabbá vált). Ezt fontos volt kidolgozni, mivel ez a lépés (DB) iteratív jellegű. A módszer fejlesztése során több növényfajból több antibakteriális anyagot sikerült kivonni, melyek (pl. a transz-krizantenol kivételével) gátolták a XEU-t, míg más baktériumokra másképpen hatottak (ld. 1. Táblázat és az itt idézett cikkek). Az anyagok meghatározásához alkalmazott kapcsolt technológiákat áttekintettük (\*Moricz and Ott 2017).

A TLC-s vizsgálatokban paprikából az 50%-os etanolos és az acetonnal kivont minták voltak legjobban kezelhetők, és a legjobb felbontást a számos kipróbált eluens közül a n-hexán-etil-acetát 30:70 arányú oldószer elegye adta. A DB vizsgálatok során a *B. subtilis* és a XEU ellen is hatékonynak bizonyult 3 elválasztott anyag, melyek Rf-értéke 0,1, 0,2, és 0,44. Extrahálási módszereinkkel nem találtunk különbséget a nem fertőzött és fertőzött paprikák között, viszont a GDS paprikából származó minták általában kifejezettebb hatást mutattak ugyanazon Rf-értékeken, ezért a vizsgálatainkat a GDS paprika mintákkal folytattuk tovább. Természetesen ezen anyagok az XS paprikában is megtalálhatóak, de kisebb mennyiségben. A derivatizálási tesztek során az antibakteriális hatású foltok, a primulin reagens esetében mutattak aktivitást. A primulin a lipofil anyagok, mint a zsírsavak és származékaik kimutatására alkalmas. Az eredmények fényében a GDS gyökér és levél extraktumokat zsírsav standardokkal (linol-, linolén- és olajsav) is megfuttattuk egymás mellett. A futtatás igazolta, hogy az egyik aktív folt (Rf: 0,44) egy zsírsav. Az aktív foltban lévő anyag eluálását etanollal végeztük. Az anyag tisztaságáról és aktivitásáról vissza-kromatografálással és DB-vel meggyőződünk. A pontos meghatározás érdekében HPLC-DAD-ESI-MS műszerrel igazoltuk a standarddal megegyező retenciós idő, UV-spektrum és MS-spektrum alapján, hogy az izolált anyagunk a linolsav.

1. Táblázat DB által irányított technológiák antibakteriális anyagok meghatározására

BAKTÉRIUMOK	BIOAKTÍV ANYAGOK	TECHNOLÓGIÁK (TLC-DB mellett)	REFERENCIA
A, P	eukaliptol, eugenol, t-fahéjsav aldehid timol terpinén-4-ol	GC, GC-MS	*Horváth et al. 2013

A,P	többféle	OPLC, SPME-GC/MS, HPLC/MS/MS	*Móricz et al. 2013
A,B,P,X	szklareol linalool linalil acetát karvon	GC-FID, GC-MS, HPLC-MS	*Móricz et al. 2015b
A,B,P,R,X	t-krizantenol cis-krizantenol t-krizantenil acetát	HPTLC-DART-MS, SPME-GC-EI-MS	*Móricz et al. 2015a
A,B,P,X	pl. spiroéterek, alfa-biszabolol	BioArena, TLC, HPTLC, OPLC	*Móricz and Ott 2015
A,B,L,P,X	matrikária észterek	HPTLC-DART-MS, HPTLC-ESI-MS, flash-C, NMR, SPME-GC-EI-MS, HPLC-ESI-Q-TOF	*Móricz et al. 2016
A,B,M,S,X	linolsav olajsav	HPLC-DAD-ESI-MS	*Krüzselyi et al. 2016b
A,B,E,L,M, P,S,X	linolsav linolénsav onopordopikrin	infusion-transzfúzió OPLC, HPLC-DAD-ESI-MS/MS, flash-C, NMR	*Móricz et al. 2017

A, *Aliivibrio fischeri*; B, *Bacillus subtilis*; E, *Escherichia coli*; L, *Lactobacillus plantarum*; M, methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*; P, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*; R, *Ralstonia solanacearum*; S, *Staphylococcus aureus*; X, *Xanthomonas euvesicatoria*; t-, transz-; OPLC, 'Overpressured Layer Chromatography'; FID, 'Flame Ionization Detection'; DART, 'Direct Analysis in Real Time'; SPME, 'Solid-Phase Microextraction'; EI, 'Electron Impact'; flash-C, 'flash chromatography'

## Megvitatás

Módszer-együttest fejlesztettünk ki, melynek segítségével hatékonyabban, egyszerűbben és olcsóbban juthatunk el valamely kívánt tulajdonságú (antibakteriális) anyaghoz, különböző növényi alapanyagból. Az általában csak humán környezetből származó tesztbaktérium-panelt bővítettük 3 növénypatogén fajjal, ami egyedülálló. Paprikából sikerült 3 XEU-t gátló anyagot kimutatni, melyek preformáltak, vagyis eleve jelenlevők, nem a fertőzés indukálja őket. Bár a GDS némileg aktívabb volt ebben a tekintetben, nem tartjuk valószínűnek, hogy e 3 anyag valamelyike meghatározó lenne a GDS mechanizmusába. A GDS és/vagy az alapvető rezisztencia egyik komponenseként viszont el lehet őket képzelni. Az egyik anyagot linolsavként határoztuk meg, ami érdekes módon egy elsődleges anyagcsere termék. További érdekesség, hogy a linolsav hatás spektrumába ismereteink szerint csak a Gram-pozitív baktériumok tartoznak bele. Kérdés, hogy eljut-e, s ha igen, milyen módon, ez az anyag a baktériumhoz, mely köztudottan a növényi sejteken kívül helyezkedik el. Legegyszerűbben a különböző, sejten belüli helyeken tartózkodó anyagok a gazdasejt halálával és az azt követő szétesésével kerülhetnek a baktériumok közelébe, de GDS esetében a gazdasejt épen marad, nincs hiperszenzitív reakció.

## Proteomika

### Általános Proteomika

#### Bevezetés

A proteomika segítségével egyszerre, párhuzamosan, sok adat gyűjthető olyan molekulacsoportról (fehérjék), mely rendkívül sokoldalú funkciós és lokalizációs lehetőségei révén akár közvetlenül is részt vehet a baktérium visszaszorításában. Ezt a gondolatot tovább véve, azokat a fehérjéket kerestük, melyek közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a fertőző baktérium sejtekkel, vagyis a sejtfalból viszonylag könnyen kimosható, kioldható fehérjéket. Ezeket az ún. "sejtközötti mosófolyadék" tartalmazza.

## Módszerek

A standard kezelést végeztünk (ld. Kezelések c. rész; fertőzés: XEU 1e8 sejt/ml dózisban). A proteomika feladat kivitelezésére először kétdimenziós elektroforézist (2DE), majd ennek fehérje jelöléses változatát (DIGE), terveztük, végül azonban a legérzékenyebb módszert, az UPLC-MS-MS-t (MTA TTK MS Proteomikai Kutatócsoport) választottuk, fehérje jelölés nélkül. (A választás egyéb okait bővebben taglaljuk a Tervtől való eltérések indoklása c. részben.) Szekvenciális fehérje kioldást végeztünk a sejtfalból Boudart et al. (2005) munkájából és az MS labor visszajelzéseiből kiindulva. A sejtközötti mosófolyadék lehető legkíméletesebb és leggyorsabb kinyerésére módszert fejlesztettünk, s mivel ez fehérjére nézve nagyon híg, dúsítására és fehérjére nézve tisztítására metanol-kloroform alapú kicsapási módszert dolgoztunk ki. A sejtközötti mosófolyadékból, annak kicsapása előtt, az alakos elemeket eltávolítottuk.

A kicsapott fehérjéket ultrahang segítségével 0,2%-os Rapigest, 8M urea elegyében visszaoldottuk. A mintákat ezt követően redukáltuk, alkiláltuk, majd LysC és tripszin enzimekkel megemésztettük. A képződött peptidkeveréket C18 spin oszlopon sómentesítettük, majd nanoUHPLC-MS/MS technikával (Dionex Ultimate 3000 - Bruker Maxis II ETD) analizáltuk.

Adat feldolgozás: A nyers gépi (tömegspektrometriai) adatokat Byonic kereső motor szoftver csomag (Protein Metrics Inc.) segítségével dolgoztuk fel, az UniProt adatbázis paprika és Xanthomonas peptideket tartalmazó rekordjait alapul véve. A spektrumokból és a hozzájuk tartozó fehérje találatokból álló adathalmazt adatbázisba (MySQL, Oracle) szerveztük, az adatbázis normalizáltuk. A nagyobb automatizációt igénylő lekereséseket az adatbázisból a Python MySQLdb, a numerikus és grafikus feldolgozást elsősorban a Python Numpy és Matplotlib csomagok segítségével végeztük. Az UPLC-MS-MS módszer inkább kvalitatív, mint kvantitatív értékelést tesz lehetővé, egy egyszerű kétlépcsős normalizációt is alkalmaztunk a nagyobb mennyiségi különbségek felkutatására.

## Eredmények

Mintánként (18 minta) 17000 - 20000 spektrumot lehetett kb. 4000 - 5000 peptidhez rendelni, utóbbiak pedig kb. 800 - 1000 fehérjéhez tartoztak (Uniprot-Swissprot adatbázis paprika és Xanthomonas rekordjai alapján).

Mindösszesen kb. 1400 féle fehérjére kaptunk találatot (azonosítottunk), ami több, mint kétszerese az előzetes 2DE analízis során becsült fehérje foltoknak (kb. 600). Az 1400 fehérje közül kb. 240 (17%) volt Xanthomonas-é, de az innen származó összintenzitás (ami a fehérje mennyiségére utal) csak 1.5%-a volt a növényének. Ennek a 1.5%-nak is majdnem 80%-a jött a 24 órás XS (érzékeny) növényi mintából. A módszer még endofiton baktériumok egyes fehérjéit is kimutatta, és bár a mennyiség igen kevés, a GDS mintákban konzekvensen nagyobb és időben állandó volt az összintenzitás, mint az érzékeny levélben, ahol kisebb volt és idővel csökkent.

Mivel a kvalitatív elemzés ennél a módszernél testreszabottabb a kvantitatívnál, a kezelések fehérjeiben mutatkozó különbségeket a kezeléseknek megfelelő csoportok számaival mutatjuk be. A kvantitatív (intenzitás-normalizálást követő) elemzés ezeket az eredményeket megerősítette.

288 fehérje közösen előfordult mind a 18 mintában, és további 158 legalább 2 ismétlésben megvolt valamennyi mintából: ez együtt kb. a fehérjék 30%-a, tehát 70%-uk része volt valamilyen különbségnek a kezelések között.

Az érzékeny növényekből kb. 15%-kal (23%-kal) több féle fehérje volt kimutatható, mint a GDS-ből, de a különbség nagyobb része volt bakteriális eredetű, mint növényi. Az összintenzitás (fehérje mennyiség) már 19%-kal volt több az érzékeny növényben, mint GDS-ben.

Időbeni dinamika:

A kvalitatív elemzéshez fehérje csoportokat állítottunk fel az időpontoknak (0, 6, 24 óra) és organizmusnak (2 növény, baktérium) megfelelően és ezen csoportokhoz tartozó fehérje találatok számának kezeléspáronkénti összehasonlításából készítettük az 2. Táblázatot. Következtetéseink:

Baktérium fehérjék:

A Xanthomonas fehérje találatok száma időben nőtt érzékeny növényben, ahogy ez várható is volt, sokkal nagyobb mértékben, mint a GDS növényekben. Így pl. 24 órában (1 nappal a fertőzés után) az érzékeny XS növényben 129-cel

több fehérje volt azonosítható, mint GDS-ben. Az XS növényben, 24 órában, a bakteriális fehérje találatok számának növekedése jóval elmaradt a bakteriális MS jel intenzitás növekedésétől, jelezve, hogy az összes jelentősebb extracelluláris fehérjét detektáltuk a baktériumból.

#### Növényi fehérjék:

GDS-ben 6 órában volt a legtöbb találat, ekkor tehát egyértelmű csúcs található, 24 órában az extracelluláris fehérjék száma látványos mélypontra esett. Az érzékeny növényben időben folyamatos (kb. 20%-os) találatszám növekedés volt. 6 órában a két növény jobban hasonlított egymásra, mint akár a 0 órában. Az összintenzitás kissé másképp alakult, fokozatosan nőtt az idővel mindkét növényi vonalban, bár az érzékenyben nagyobb mértékben, ami 24 órára kb. a 2-szeres a kezdethez képest (GDS-ben 1.7-szeres). Mint említettük, az összintenzitás értékébe a baktériumok csak kis mértékben szólnak bele.

Fertőzés után 24 órával már egyértelműen, messze a legnagyobb különbséget láttuk a két növény között. A rezisztens GDS-ben detektált fehérjék száma visszaesett, míg az érzékeny növényben még tovább nőtt.

A 2. Táblázatban szereplő fehérje csoportok funkcionális tartalmát itt nem részletezzük, tekintettel arra, hogy az adatok még nincsenek leközzölve

2. Táblázat: Kezelés párok fehérje készletének különbségei és átfedései, paprika és Xanthomonas fehérjék szerinti bontásban. Zárójelben az időpont fertőzés után. XS, érzékeny növény; mínusz "-" jel, bal oldali kezelésben jelenlevő, de a jobb oldaliban hiányzó fehérjék; &, bal és jobb oldali kezeléseket közös fehérjéi. "Megtalálható" az a fehérje, mely a 3 ismétlés közül legalább 2-ben ott volt, "nem megtalálható" az, ami egyik ismétlésben sincs. Ez a szigorítás a különbségeknél szűkíti az eredményt)

#### Xanthomonas fehérjék:

GDS (0) :	10	XS (0) :	7		
GDS (6) :	34	XS (6) :	48		
GDS (24) :	51	XS (24) :	201		
GDS (0) -GDS (6) :	1	GDS (6) -GDS (0) :	20	GDS (0) &GDS (6) :	7
GDS (6) -GDS (24) :	6	GDS (24) -GDS (6) :	20	GDS (6) &GDS (24) :	22
GDS (0) -GDS (24) :	3	GDS (24) -GDS (0) :	39	GDS (0) &GDS (24) :	5
GDS (0) -XS (0) :	2	XS (0) -GDS (0) :	0	GDS (0) &XS (0) :	6
GDS (6) -XS (6) :	0	XS (6) -GDS (6) :	6	GDS (6) &XS (6) :	29
GDS (24) -XS (24) :	4	XS (24) -GDS (24) :	129	GDS (24) &XS (24) :	46
XS (0) -XS (6) :	1	XS (6) -XS (0) :	34	XS (0) &XS (6) :	6
XS (6) -XS (24) :	5	XS (24) -XS (6) :	128	XS (6) &XS (24) :	41
XS (0) -XS (24) :	0	XS (24) -XS (0) :	176	XS (0) &XS (24) :	6

#### Paprika fehérjék:

GDS (0) :	700	XS (0) :	650		
GDS (6) :	744	XS (6) :	743		
GDS (24) :	639	XS (24) :	780		
GDS (0) -GDS (6) :	33	GDS (6) -GDS (0) :	55	GDS (0) &GDS (6) :	603
GDS (6) -GDS (24) :	83	GDS (24) -GDS (6) :	33	GDS (6) &GDS (24) :	565
GDS (0) -GDS (24) :	74	GDS (24) -GDS (0) :	46	GDS (0) &GDS (24) :	541
GDS (0) -XS (0) :	54	XS (0) -GDS (0) :	14	GDS (0) &XS (0) :	584
GDS (6) -XS (6) :	32	XS (6) -GDS (6) :	27	GDS (6) &XS (6) :	638
GDS (24) -XS (24) :	53	XS (24) -GDS (24) :	151	GDS (24) &XS (24) :	532
XS (0) -XS (6) :	17	XS (6) -XS (0) :	84	XS (0) &XS (6) :	594
XS (6) -XS (24) :	89	XS (24) -XS (6) :	134	XS (6) &XS (24) :	577
XS (0) -XS (24) :	54	XS (24) -XS (0) :	172	XS (0) &XS (24) :	535



A tömegspektrometriás módszer jóval érzékenyebbnek bizonyult a 2DE-nél, és az automatizáció részletesebb, rendszerszerű adatelemzést tett lehetővé. Az érzékenységet jellemzi, hogy az UPLC-MS-MS 6 és 24 órában már jelezte a baktériumok számának növekedését.

Az endofitonokra jellemző fehérjék adatai azt sugallják, hogy a kórfolyamat, a gazdanövény betegsége ezekre az együtt élő baktériumokra negatív hatással van. Ez különleges, mivel a virulens baktériumoknak jobban ismert az a hatása, hogy az egyéb jelen levő baktériumok, pl. szaprofitonok számára a növényben kedvezőbb feltételeket teremtet.

Az extracelluláris fehérjékben a kezelések nyomán kialakult 70% körüli variabilitást magasnak tartjuk, tehát ez a proteom különösen érzékenyen reagál a fertőzésre. Ebben az időszakban a növényi hírvivő RNS-eknek "csak" mintegy negyede fejeződött ki különbözőképpen (ld. Transzkriptomika c. részt).

Úgy látszik, hogy fertőzésre a sejten kívüli proteom élénkebben reagál érzékeny levélben, mint a GDS-ben. Az extracelluláris proteom ezen indukált változása feltehetően a baktérium elszaporodását segíti, vagy sérülés következménye lehet. Az utóbbinak ellentmond a tünettan megfigyelés (ld. Tünettan c. fejezet). Mivel 6 órában a két növényben azonosított fehérje készlet feltűnően hasonló volt, e korai időszakban valamilyen általános válasza (is) lehet gyanakodni, mint pl. a PTI. Az említett 6 órai fehérje találatok csúcs GDS-ben emlékeztet a génátírás aktivitásának erős növekedésére is ebben az időpontban, ebben a növényvonalban (ld. Transzkriptomika c. fejezetet). A növényekben azonban a génátírást rendszerint több órás közbenső folyamatok követik a fehérjék megjelenéséig és főleg szekréciójáig, tehát nehéz a transzkripciót és az extracelluláris proteomot időben összeegyeztetni.

24 órában (24 órával a fertőzés után) a két növényben ellentétes irányú fehérje szekréciós stb. folyamatok eredményezték a tapasztalt nagy különbséget, melyről a funkcionális elemzés többet árul el.

## Glikoproteomika

### Bevezetés

A fehérje glikozilálás a legsokoldalúbb változtatás típusa fehérjéken a translációt követően. A glikozilálás alapvetően megváltoztatja a fehérjék tulajdonságait, ezzel kihat a strukturális, enzimatikai és jelátviteli folyamatokra is. Mintáink előzetes proteomikai LC-MS-MS futtatása során feltűnt a peptidek nagyfokú modifikáltsága, amiről később kiderült, hogy elsősorban glikozilációnak köszönhető. Érdekes, hogy az ismert bakteriális glikoproteinek a sejt felszínén helyezkednek el, tehát a gazdaszervezetnek leginkább kitett részen. Mégis, fontossága ellenére ez a téma még kevésbé ismert gazda-baktérium kapcsolatban. Ezért úgy döntöttünk, hogy részleteiben is megvizsgáljuk.

### Módszerek

Az Általános Proteomika c. fejezetben említettek szerint jártunk el a fehérjék minta előkészítéséhez, affinitás kromatográfiás eljárásokat mellőzve. A glikozilált fehérjék kimutatásához a nagyműszeres protokoll és az azt követő adatfeldolgozás részben eltért, annak érdekében, hogy N-glikánokat határozhatunk meg a mintákból.

### Eredmények

Peptidek:

Az előállt MS spektrumok összesen kb. 21000 féle peptidet határoztak meg. Ezek 20%-át láttuk glikozilált állapotban, mintegy 60 db-ot pedig 2, esetleg 3 féle glikánnal is. Nem láttunk olyan peptidet, ami előfordult volna glikoziláltan és glikán nélkül is. A glikánok monoszaharid összetétele szintjén 244 féle kombinációt számoltunk, tehát az összeset, ami növényi adatok alapján várható és keresett volt; a predomináns glikán a Hex5HexNAc2 volt. A glikán építőkövek igen változatosak (KDN, dHex, HexA, NeuGc, Hex, NeuAc, Pen, Neu, HexNAc) voltak, esetenként kénezett és metilált származékokkal.

Fehérjék:

A mintákban összesen talált különböző fehérjék 44%-a, volt olyan, aminek peptid származékai közül legalább egy glikozilálódott - tehát glikoprotein volt. Ezekből 76 volt baktérium eredetűnek tulajdonítható. GDS növényekben 602, XS-ben 638 féle volt belőlük, és eloszlásuk a kezelések között általában követte az Általános Proteomika c. részben vázolt trendeket, amennyiben a GDS növényben 6 órában csúcs volt tapasztalható a glikoproteinek számában, míg XS növényekben számuk folyamatosan növekedett (3. Táblázat és más számítások). A glikoproteinekhez tartozó jel intenzitás -- nagyobb arányban, mint az össz-fehérjéé, és mint a hozzá tartozó fehérjék száma -- mindkét növényben folyamatosan nőtt. Ezzel együtt, az egy fehérjére eső intenzitás glikoproteineknél kisebb volt, mint nem glikoproteineknél. A glikoproteinek intenzitás részaránya az összfehérjéjéhez képest sokkal kisebb (huszadaötvenede) volt baktériumokból, mint növényből. Számuk aránya (kb. 30-40%) ezzel szemben megközelítette a növényekét (kb. 55%). XS növényekben 24 órában a bakteriális glikoproteinek mennyisége (intenzitása) látványosan megnőtt, de mégis kevésbé, mint a nem glikoproteineké. Meghatároztuk azokat a fehérje csoportokat, melyek segítségével a kezelések funkcionálisan összehasonlíthatók (3. Táblázat). Ezeket a funkciókat itt nem tárgyaljuk, de megemlítjük, hogy a pl. a közismert MAMP flagellint csak a korai mintákban találtuk meg, a kései XS növényi mintákból már nem.

3. Táblázat: Kezelés párok N-glikozilált fehérje készletének különbségei és átfedései, paprika és Xanthomonas fehérjék szerinti bontásban. Jelmagyarázatot ld. az 2. Táblázatban.

Xanthomonas fehérjék:

GDS (0) : 5	XS (0) : 5	
GDS (6) : 17	XS (6) : 21	
GDS (24) : 20	XS (24) : 55	
<hr/>		
GDS (0) -GDS (6) : 2	GDS (6) -GDS (0) : 12	GDS (0) &GDS (6) : 3
GDS (6) -GDS (24) : 2	GDS (24) -GDS (6) : 7	GDS (6) &GDS (24) : 11
GDS (0) -GDS (24) : 1	GDS (24) -GDS (0) : 15	GDS (0) &GDS (24) : 3
<hr/>		
GDS (0) -XS (0) : 1	XS (0) -GDS (0) : 1	GDS (0) &XS (0) : 3
GDS (6) -XS (6) : 2	XS (6) -GDS (6) : 0	GDS (6) &XS (6) : 14
GDS (24) -XS (24) : 1	XS (24) -GDS (24) : 23	GDS (24) &XS (24) : 19
<hr/>		
XS (0) -XS (6) : 1	XS (6) -XS (0) : 15	XS (0) &XS (6) : 4
XS (6) -XS (24) : 4	XS (24) -XS (6) : 26	XS (6) &XS (24) : 16
XS (0) -XS (24) : 1	XS (24) -XS (0) : 48	XS (0) &XS (24) : 3

Paprika fehérjék):

GDS (0) : 391	XS (0) : 378	
GDS (6) : 401	XS (6) : 400	
GDS (24) : 352	XS (24) : 398	
<hr/>		
GDS (0) -GDS (6) : 18	GDS (6) -GDS (0) : 25	GDS (0) &GDS (6) : 337
GDS (6) -GDS (24) : 37	GDS (24) -GDS (6) : 10	GDS (6) &GDS (24) : 319
GDS (0) -GDS (24) : 36	GDS (24) -GDS (0) : 17	GDS (0) &GDS (24) : 300
<hr/>		
GDS (0) -XS (0) : 19	XS (0) -GDS (0) : 9	GDS (0) &XS (0) : 332
GDS (6) -XS (6) : 17	XS (6) -GDS (6) : 10	GDS (6) &XS (6) : 358
GDS (24) -XS (24) : 28	XS (24) -GDS (24) : 59	GDS (24) &XS (24) : 293
<hr/>		
XS (0) -XS (6) : 18	XS (6) -XS (0) : 26	XS (0) &XS (6) : 342
XS (6) -XS (24) : 40	XS (24) -XS (6) : 44	XS (6) &XS (24) : 319
XS (0) -XS (24) : 32	XS (24) -XS (0) : 46	XS (0) &XS (24) : 316

## Megvitatás

A baktérium oldalt és magát a kölcsönhatást illetően, az egyetemes ismeretek hiányosságai miatt, nem könnyű eredményeinket értelmezni, de ezen a részletetekbe menő funkcionális analízis változtatni fog. Emberi rákos sejtvonalak fehérje glikánjaival (Holst et al. 2016) összehasonlítva a sejtfalból kimosott paprika fehérjék glikánjai és azok építőkövei változatosabb képet mutattak. A 76 azonosított bakteriális glikopeptid szám a legutóbbi pár év bővülő ismereteinek fényében reálisnak mondható, elsősorban a humán-baktérium kölcsönhatás vizsgálatok alapján (pl. Tan et al. 2015). Szembetűnő, hogy a baktériumban a glikoproteinek átlagos mennyisége alacsony. A paprika-

Xanthomonas kapcsolatban a glikoproteinek a többi fehérjéhez hasonló irányban változtak a kezelések hatására, de kisebb amplitúdóval, ami a glikoproteinek viszonylagos stabilitására utal. Ez a stabilitás összhangban van azzal, hogy a legtöbb ismert bakteriális glikoprotein felszíni, strukturális, így akár MAMP szerepet tölt be, mely utóbbi fontos lehet a kórfolyamat kimenetele szempontjából. A flagellin hiánya az XS növényben 24 órában sejteti, hogy a baktériumnak ekkorra már nincs szüksége az ostor által biztosított mozgásra.

## Projekt által támogatott (\*) és egyéb irodalom:

- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MA, Quezado-Duval AM. Simultaneous detection and identification of the Xanthomonas species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 2012 113:1479-90.
- Ashrafi H, Hill T, Stoffel K, Kozik A, Yao J, Chin-Wo SR, Van Deynze A. De novo assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): a benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. *BMC Genomics.* 2012 13:571.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT, Pont-Lezica R. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics.* 2005 5:212-221.
- \*Bozsó Z, Ott PG, Kámán-Tóth E, Bognár GF, Pogány M, Szatmári Á. Overlapping Yet Response-Specific Transcriptome Alterations Characterize the Nature of Tobacco-Pseudomonas syringae Interactions. *Front Plant Sci.* 2016 7:251.
- Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Klement Z. 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.* 1999. 55:215-223.
- \*Burketova L, Trda L, Ott PG, Valentova O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnol Adv.* 2015 33:994-1004.
- Csillery G, Szarka E, Sardi E, Mityko J, Kapitany J, Nagy B, Szarka J. The unity of plant defense. Genetics, breeding and physiology. XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Noordwijkerhout, The Netherlands. Proceedings. 2004 147-153.
- Fan J, Crooks C, Lamb C. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens luxCDABE*. *Plant J.* 2008 53:393-399.
- Holst S, Deuss AJ, van Pelt GW, van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, Koeleman CA, Deelder AM, Mesker WE, Tollenaar RA, Rombouts Y, Wuhler M. N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homebox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. *Mol Cell Proteomics.* 2016 15:124-140.
- \*Horváth Gy, Kocsis B, Lemberkovics É, Böszörményi A, Ott PG, Móricz ÁM. Detection of antibacterial activity of essential oil components by TLC-bioautography using luminescent bacteria. *Journal of Planar Chromatography* 2013 26:114-118.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science.* 2007 318:648-651.
- \*Krüzselyi D, Bozsó Z, Csillery G, Szarka J, Bognár GF, Ott PG. Two non-necrotic disease resistance types distinctly affect expression of key pathogenic determinants of *Xanthomonas euvesicatoria* in pepper. In: Ertsey-Peregi K, Füstös Zs, Palotás G, Csillery G (Eds): Proc. XVIth EUCARPIA Capsicum and Eggplant Working Group Meeting, 12-14 September, 2016a, Kecskemét, Hungary, pp. 559-563.
- \*Krüzselyi D, Nagy R, Ott PG, Móricz ÁM. Rapid, Bioassay-Guided Process for the Detection and Identification of Antibacterial Neem Oil Compounds. *J Chromatogr Sci.* 2016b 54:1084-1089.
- \*Móricz ÁM, Häbe TT, Böszörményi A, Ott PG, Morlock GE. Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015a 1422:310-317.
- \*Móricz ÁM, Horváth Gy, Ott PG. Direct Bioautographic Detection of Antibacterial Components of Clary Sage and Spearmint Essential Oils. *Journal of Planar Chromatography* 2015b 28:173-177.
- \*Móricz ÁM, Krüzselyi D, Alberti Á, Darcsi A, Horváth G, Csontos P, Béni S, Ott PG. Layer chromatography-bioassays directed screening and identification of antibacterial compounds from Scotch thistle. *J Chromatogr A.* 2017 1524:266-272.
- \*Móricz AM, Ott PG, Alberti A, Böszörményi A, Lemberkovics E, Szoke E, Kéry A, Mincsovcics E. Applicability of preparative overpressured layer chromatography and direct bioautography in search of antibacterial chamomile compounds. *J AOAC Int.* 2013 96:1214-1221.
- \*Móricz ÁM, Ott PG, Häbe TT, Darcsi A, Böszörményi A, Alberti Á, Krüzselyi D, Csontos P, Béni S, Morlock GE. Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*. *Anal Chem.* 2016 88:8202-8209.
- \*Móricz ÁM, Ott PG. Direct Bioautography as a High-Throughput Screening Method for the Detection of Antibacterial Components from Plant Sources. *J AOAC Int.* 2015 98:850-856.
- \*Moricz AM, Ott PG. Screening and characterization of antimicrobial components of natural products using planar chromatography coupled with direct bioautography, spectroscopy and mass spectrometry: a review. *Current Organic Chemistry* 2017 21:1861-1874.

- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hrp gene-dependent and hrp gene-independent mechanisms. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001 14:785-792.
- \*Szatmári Á, Zvara Á, Móricz ÁM, Besenyi E, Szabó E, Ott PG, Puskás LG, Bozsó Z. Pattern triggered immunity (PTI) in tobacco: isolation of activated genes suggests role of the phenylpropanoid pathway in inhibition of bacterial pathogens. *PLoS One*. 2014 9:e102869.
- Szarka J, Csilléry G. Defence systems against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper. IXth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant. Budapest, Hungary. Proceedings. 1995 184-187.
- Tan FY, Tang CM, Exley RM. Sugar coating: bacterial protein glycosylation and host-microbe interactions. *Trends Biochem Sci*. 2015 40:342-350.
- Van Bel M, Proost S, Van Neste C, Deforce D, Van de Peer Y, Vandepoele K: TRAPID, an efficient online tool for the functional and comparative analysis of de novo RNA-Seq transcriptomes. *Genome Biol*. 2013 14:R134.

## Tervtől való eltérések indoklása

Az alapkérdések és az alaprendszer nem változott, a számos eltérés elsősorban metodikai természetű. Az eltérések okai nagyrészt a tudományos módszertan lényeges fejlődése/fejlesztése a projekt ideje alatt, és néha sajnos a szakember hiány miatti kompromisszum kényszerűség is közrejátszott.

**Genomika:** Az eredeti tervekben kvantitatív PCR szerepelt, még kiválasztandó gének alapján. Ehelyett egy sokkal adatdúsabb, korszerűbb, prekonceptió nélküli módszerre, az RNS szekvenálásra nyílt alkalmunk. Ezzel az egész projekt egy egységes, alulról építkező, 'omikai' jelleget kezdett öltetni, ami a legalkalmasabb megközelítés akkor, ha valami újat keresünk. A módszer hátránya éppen a nagy adattömeg, aminek kezeléséhez sokat kellett tanulni. A "sok" itt éveket jelent, az egyéb feladatok végzése mellett. A tanulás a projektfelelősre hárult, nem szeretett volna elszakadni az adatoktól és arra számított, hogy az időbefektetés hosszú távon megtérül, mert egyre több omikai projekt indul majd ahol ez a tudás kamatoztatható. A NÖVI-ben ez a módszertan újdonság, így a tanulás önerőből ment, ingyenes alapszoftvereket (MySQL, Python, R, VIM) célba véve. Eljutottunk addig, hogy már nem jelent akadályt nagy mennyiségű, bármilyen típusú adat kezelése, feldolgozása. Ezt a rutint már a proteomikai adatokhoz már hatékonyan tudtuk használni. A projekt vége felé forrásokat csoportosítottunk egy következő RNS szekvenálási ciklusra, ahol igyekeztünk a baktérium partnerre jobban koncentrálni. Ez utóbbi ciklus értékelésének még az elején tartunk.

**Proteomika:** Az eredeti tervekben kétdimenziós elektroforézis szerepelt mint módszertan. Ezt ki is dolgoztuk, majd még korszerűbbé tettük egy megkülönböztető fehérje festési technikával ('DIGE'). Ezt egy fiatal segédmunkatársunk végezte, de felmondott, mielőtt kiértékelte volna. A helyébe lépő munkatársunk az elemzést nem tudta elvégezni egy korábbi technikai hiba miatt. Ismételni nem tudtunk, mert ez a munkatársunk is felmondott, státusát pedig az Intézet nem tartotta tovább fenn, pótolni így nem tudtuk. Sajnos a tervezett fehérje foszforilációs vizsgálat is erre a személyre és metodológiára épült volna. Ezután felvettünk egy fiatalembert, aki be sem jött munkakezdésre, úgy mondott fel. 2015 végén pedig szintén egy fiatal segédmunkatárs mondott fel, akit nem tudtunk megfelelően pótolni. Az Intézet házon belüli munkatársak alkalmazását szorgalmazta, akikkel ez a probléma sajnos nem oldódott meg. 2017 elején még sikerült felvenni egy ismerős PhD hallgatót, de neki 3 hónap után nem hosszabbították meg a szerződését, a projektvezető kérése ellenére. Közben az idő múlásával egy gyorsabb, időközben nagy fejlődésen keresztül ment technika lehetősége merült fel, az UPLC-MS-MS. Ez egy mennyiségre kevésbé pontos, de rendkívül érzékeny és sok adatot szolgáltató proteomikai módszer, amivel az időbeli lemaradást részben be lehetett hozni. Ugyanezt a technikát használtuk a fehérje glikom (glikozilált fehérjék) kimutatására, a foszforiláció vizsgálata helyett. Erre szakmai indokunk is volt, mert az előzetes mérések és tapasztalatok alapján jobb esélyünk volt egy gazdag extracelluláris glikom kimutatására, mint a ritkább foszforilációs eseményekére. Ehhez a munkához szerencsénkre kaptunk segítséget a Biokémiai Csoporttól.

**Metabolomika:** A rezisztencia definíciószerűen gátolja a kórokozót. Ennek számos eleme lehet, legegyszerűbb esetben valamilyen közvetlenül gátló anyag. Miután kiderült, hogy a GDS során indukált ilyen anyagot nem tudunk kimutatni, viszont preformált anyagokat igen, csatlakoztunk a Biokémiai Csoport munkájához, és azon dolgoztunk együtt, hogy a növényekből minél gyorsabban és egyszerűbben tudjunk baktérium gátló anyagokat meghatározni. Ez az interdiszciplináris közös munka egyre bővült, új kapcsolatok épültek ki új szempontokkal és célokkal (ahogy ez kooperációban gyakori eset) és ezen a vonalon több publikáció is született. Nagy rá az érdeklődés, mivel kellenek az új hatóanyagok, így gyakorlati hasznosíthatóság vetülete is van.