

**Szimbiotikus eredetű, antimikrobiális típusú
peptidek hatása *Sinorhizobium meliloti*
baktériumra**

Doktori/Ph.D. értekezés

Tiricz Hilda Anikó

Témavezető: Dr. Kereszt Attila

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémia Intézet

2013.

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| 1. BEVEZETÉS | 5 |
| 1.1. A biológiai nitrogénkötés jelentősége | 5 |
| 1.2. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása | 9 |
| 1.2.1. A jelmolekulák szerepe | 9 |
| 1.2.2. A növényi hormonok szerepe | 10 |
| 1.2.3. A gyökérgümő kialakulása | 11 |
| 1.3. A gyökérgümők típusai és jellemző szerkezetük | 13 |
| 1.4. A bakteroid átalakulás | 16 |
| 1.5. Az NCR géncsalád jellemzése | 21 |
| 1.6. Az NCR molekulák feltételezett szerepe | 23 |
| 2. CÉLKITŰZÉSEK | 25 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 27 |
| 3.1. Anyagok..... | 27 |
| 3.1.1. Felhasznált baktérium törzsek és <i>in vitro</i> növekedési körülményeik | 27 |
| 3.1.1.1. Az <i>S. meliloti</i> 1021 törzs <i>in vitro</i> növekedési körülményei | 27 |
| 3.1.1.2. Patogén és nem patogén törzsek vizsgálata..... | 27 |
| 3.1.2. Az NCR peptidek | 27 |
| 3.2. Módszerek | 29 |
| 3.2.1. NCR peptidek <i>in vitro</i> aktivitás vizsgálata | 29 |
| 3.2.1.1. Kolóniát formáló sejtek számának meghatározása, CFU teszt | 29 |
| 3.2.1.2. A propidium-jodid (PI) teszt | 29 |
| 3.2.2. Az RNS minták készítése..... | 30 |
| 3.2.3. Az RNS minták minőségi és mennyiségi ellenőrzése..... | 30 |
| 3.2.4. Az RNS minták előkészítése szekvenáláshoz | 30 |
| 3.2.5. Az RNS minták szekvenálása | 32 |
| 3.2.6. Az adatok bioinformatikai feldolgozása | 32 |
| 3.2.6.1. A szekvenálási adatok visszatérképezése referencia genomhoz | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.2.6.2. A szekvenálási adatok normalizálása..... | 33 |
| 3.2.6.3. Az adatok kiértékeléséhez használt programok | 33 |
| 3.2.7. A szekvenálás megerősítése RT-PCR reakcióval | 34 |
| | |
| 4. EREDMÉNYEK | 36 |
| 4.1. Az NCR peptidek <i>in vitro</i> hatásvizsgálata <i>S. meliloti 1021</i> baktériumon | 36 |
| 4.2. Az NCR peptidek antimikrobiális spektruma..... | 37 |
| 4.3. Az NCR peptidek dózis-hatás vizsgálata <i>S. meliloti 1021</i> baktériumon | 39 |
| 4.4. Az <i>S. meliloti 1021</i> transzkriptom általános elemzése | 42 |
| 4.5. Az NCR peptidek által okozott általános génexpresszió csökkenés | 46 |
| 4.6. Az NCR peptidek által okozott általános génexpresszió növekedés | 47 |
| 4.7. Peptid specifikus génexpresszió növekedés | 48 |
| 4.7.1. Az NCR335 peptid specifikus génaktiváló hatása | 48 |
| 4.7.2. Az NCR247 peptid specifikus génaktiváló hatása | 49 |
| 4.8. Peptid specifikus génexpresszió csökkenés..... | 50 |
| 4.8.1. Az NCR335 peptid specifikus represszáló hatása..... | 50 |
| 4.8.2. Az NCR247 peptid specifikus represszáló hatása..... | 50 |
| 4.9. A változások áttekintése funkcionális kategóriák szerint..... | 51 |
| 4.9.1. Membránalkotó elemek és membránkapcsolt folyamatok változása..... | 51 |
| 4.9.2. Az energiaszolgáltatás..... | 55 |
| 4.9.3. Genetikai információs folyamatokat érintő változások | 57 |
| 4.9.4. A stresszválaszhoz köthető génexpressziós változások | 61 |
| 4.10. A szekvenálási adatok megerősítése..... | 63 |
| | |
| 5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA | 65 |
| | |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 72 |
| IRODALOMJEGYZÉK..... | 73 |
| MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ..... | 79 |
| ENGLISH SUMMARY | 84 |
| FÜGGELÉKEK | 89 |
| TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK | 96 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|----------------------|--|
| AMP | Antimikrobiális peptid (Antimicrobial Peptide) |
| BAC | bakteriális mesterséges kromoszóma (Bacterial Artificial Chromosome) |
| CAMP | kationos antimikrobiális peptid (Cationic Antimicrobial Peptide) |
| cDNS | komplementer DNS |
| CDS | gént kódoló DNS szekvencia (Coding DNA Sequence) |
| CFU | kolónia formáló egység; (Colony-Forming Units) |
| CTC | 5-cyano-2,3-di-4-tolyl tetrazolium chloride (redoxi festék) |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| dsDNS | kettősszalú DNS (double stranded DNA) |
| EST | kifejeződött szekvenciadarab (Expressed Sequence Tag) |
| GRP | glicin-gazdag fehérje (Glycine-Rich Protein) |
| IRLC | Inverted Repeat-Lacking Clade |
| KEGG | adatbázis (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) |
| <i>M. truncatula</i> | <i>Medicago truncatula</i> (vad típus) |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information database |
| NCR | gümő-specifikus cisztein-gazdag peptid (Nodule-specific Cysteine-Rich peptide) |
| NGS | újgenerációs szekvenálás (New Generation Sequencing technology) |
| nod | nodulációs gének |
| ORF | nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame) |
| PI | propídium-jodid |
| RNS | Ribonukleinsav |
| RT-PCR | reverz transzkripcióval előállított cDNS-en végzett polimeráz-lánreakció |
| SEM | Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope) |
| <i>S. meliloti</i> | <i>Sinorhizobium meliloti 1021</i> baktérium törzs (<i>Sm1021</i>) |
| SPC | szignál peptidáz komplex (Signal Peptidase Complex) |
| TEM | Transzmissziós elektronmikroszkóp |

1. BEVEZETÉS

1.1. A biológiai nitrogénkötés jelentősége

A talaj mikroorganizmusai a bioszféra részeként számos nélkülözhetetlen biológiai folyamat végrehajtói, nélkülük az élővilág fennmaradása és evolúciója nem volna lehetséges. Habár a természetben a kötött nitrogén utánpótlása ciklikus jellegű, a ciklus számos pontján irreverzibilis veszteség lép fel, és a nitrogén molekuláris formában távozik a rendszerből. Nitrogén elemi állapotban bőségesen található a légkörben (78%), megkötésére és redukciójára azonban csupán néhány prokarióta mikroorganizmus képes.

| SZABADONÉLŐ SZERVEZETEK NITROGÉNKÖTÉSE | |
|---|---|
| Típus | N-fixáló szervezet |
| Cianobaktériumok (kék-zöld algák) | Anabaena, Calothrix, Nostoc |
| Aerob baktérium | Azotobakter |
| Fakultatív anaerob baktérium | Bacillus, Klebsiella |
| Anaerob baktérium | Clostridium, Rhodospirillum |
| ASSZOCIATÍV NITROGÉNKÖTŐK | |
| Típus | N-fixáló szervezet |
| Aerob baktérium | Azospirillum |
| Gunnera | Nostoc |
| Azolla | Anabaena |
| Cukornád (Saccharum) | Acetobacter |
| SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉS | |
| Gazdanövény | N-fixáló szimbionta |
| Leguminosae | α-proteobaktéria: <i>Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium</i> |
| | β-proteobaktéria: <i>Cupriavidus taiwanensis, Burkholderia phymatum</i> |
| Parasponia | <i>Rhizobium fredii</i> NGR234 <i>Rhizobium tropici</i> |
| Eurosid II. klád pl. <i>Alnus glutinosa</i> | Frankia: Sugárgombák |

1. táblázat Nitrogénfixáló organizmusok csoportosítása. Szabadon élő, asszociatív és szimbiotikus nitrogénkötő szervezetek.

A biológiai nitrogénkötésre képes szervezetek nélkülözhetetlenek a jó minőségű mezőgazdasági művelésű talajok fenntartásához. Hiányukban javasolt a termőföldek szakszerű műtrágyázása, amelyek helytelen használata talajszennyezéshez vezethet. Ennek észlelhető következménye a talaj nitrátosodása.

A nitrogénkötésnek három típusát különböztetjük meg a gyakorlatban (1. táblázat). A nitrogénkötő (diazotrof) fajok egy része szabadon élő formában, más szervezetek nélkül képes a légköri nitrogén megkötésére, mint például az *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Rhodospirillum*, *Klebsiella*. Az asszociatív típusba tartozók laza kapcsolatot alakítanak ki egyes növényekkel, és mint ektoszimbionták kötik a nitrogént. Erre példa az *Azospirillum* vagy az *Azotobacter paspali* egy gabonafajta (*Paspalum*) gyökérfelületén. A harmadik, szimbionta nitrogénkötés a leghatékonyabb valamennyi típus között, ezért széles körben elterjedt az egész élővilágban (Oldroyd és Downie, 2008; Sandal és mtsai., 2002).

A pillangósvirágúak gyökérgümőiben a *Rhizobium* baktériumok által ammóniává redukált nitrogén mennyisége igen jelentős. Évente elérheti a 200-250 kg megkötött nitrogént hektáronként. Az együttműködés nemcsak a résztvevő partnerek számára előnyös, hanem alapvető jelentőségű a bioszféra nitrogén körforgalmában is. Becslések szerint a pillangósok gyökérgümőiben fixált légköri nitrogén mennyisége évente elérheti a 35-40 millió tonnát (Dashora, 2011).

| GAZDASPECIFITÁS A NÖVÉNYEK ÉS RHIZOBIUMOK KÖZÖTT | |
|---|---|
| Gazdanövény | Szimbionta Rhizobium |
| Parasponia (nem Pillangósvirágú) | <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Rhizobium tropicii</i> , <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 |
| szója (<i>Glycine max</i>) | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Sinorhizobium fredii</i> |
| lucerna (<i>Medicago sativa</i>) | <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>S. medicae</i> |
| bab (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>Rhizobium etli</i> |

2. táblázat Szimbiotikus gazdaspecifitás a növény és *Rhizobium* kapcsolatban.

A szimbiózisba lépő *Rhizobiumok* az α - és β -proteobaktériumok csoportjába tartoznak. Az ismert növényi partnerek egy kivétellel a *Leguminosae/Fabaceae* család tagjai, melyek három alcsaládba sorolhatók: a *Papilionoideae*, *Mimosoideae* és *Caesalpinioideae*. Habár a családba sorolható fajok közül nem mindegyik alkalmas nitrogénkötő szimbiózis

kialakítására, így is mintegy 12000 pillangósvirágú növénynél írták le a jelenséget. Mivel az említett baktériumok a növényi sejtekben végzik a nitrogénkötést ezért ezt a fajta együttélést endoszimbiózisnak is szokás nevezni.

A *Leguminosae* család tagjain kívül csupán a *Parasponia* nemzetség (*Ulmaceae*) képes szimbiotikus kapcsolatba lépni *Rhizobiumokkal*. A nem *Rhizobiumokhoz* sorolható *Frankia* (Gram-pozitív *Actinobacteria/Sugárgombák*) az Eurozid II. klád egyes fajaiival, például az enyves égerrel (*Alnus glutinosa*) alakít ki nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolatot. A szimbiózisban lévő fajok elválasztása egymástól időnként nehéz, mert bár az egyes törzsek meglehetősen magas specifitást mutatnak, ez a specifitás nem kizárólagos, egyes *Rhizobiumok* több társszervezettel is képesek szimbiózisban élni (2. táblázat) (Masson-Boivin és Giraud, 2009; Op den Camp és mtsai., 2012).

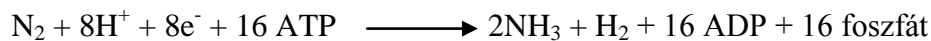
A nitrogénkötő szimbiózis kialakítása során egy új szerv, a nitrogénkötő gümő jön létre. Ez kialakulhat a száron, például a *Sesbania rostrata* esetén, amely az *Azorhizobium caulinodansal* együttműködve köti a nitrogént. A legfontosabb szimbionta nitrogénkötést végző baktériumok a Rhizobiaceae család tagjai, amelyek a pillangósvirágú növényeknek a gyökéren hozzák létre a gümőket (1. ábra).



1. ábra Nitrogénkötő gyökérgümő. A *Medicago truncatula* gyökerén található szimbiotikus szerv, a gyökérgümő (indeterminált típus), melyben a bakteroiddá átalakult *Rhizobiumok* enzimatis úton kötik a molekuláris nitrogént.

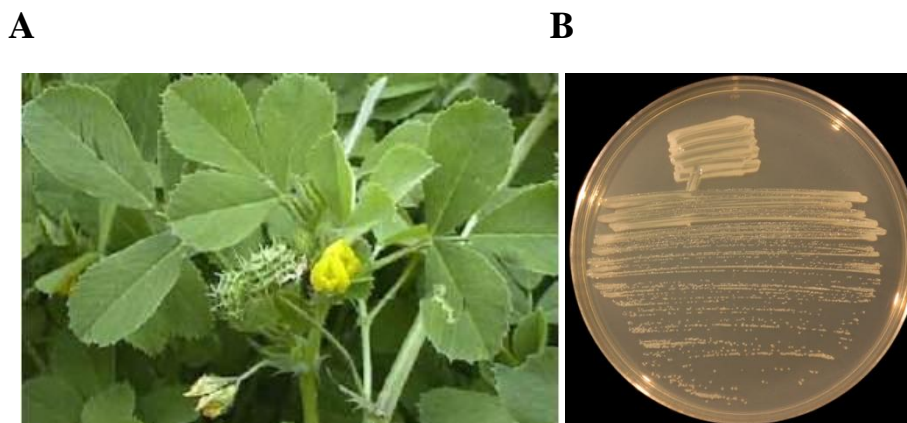
A N_2 -kötés a gyökérgümőben élő bakteroidokban történik, amelyeket a növény a fotoszintézis során előállított szénhidrátokból származó dikarbon savakkal (például almasav) lát el. Ennek oxidálásából nyerik a bakteroidok az elektronokat és az ATP-t. A szimbiotikus nitrogénkötés egy enzimatis folyamat (a nitrogenáz enzim - mely két elkülönült fehérjéből áll, egy vas-proteinből és egy vas-molibdén-proteinből - katalizálja), amely során a légköri, elemi nitrogén redukálódik a növények számára felvehető és átalakítható ammóniává (NH_3 ,

NH_4^+). A folyamat során, a molekuláris nirtogén hármas kötéseinek felbontása nagy energia befektetést, összesen mintegy 16 ATP molekulát igényel.



A redukción végző nitrogénáz enzim oxigén jelenlétében irreverzibilisen inaktiválódik, ezért a kifejlett gyökérgümőben egy oxigénkötő fehérje, a leghemoglobin működése tartja fenn a kívánt, kellően alacsony oxigénszintet.

A *Medicago truncatula* (*M. truncatula*) a Pillangósvirágúak családjába (*Leguminosae*) tartozó takarmánynövény, a tetraploid génállományú *Medicago sativa* (takarmánylucerna) közeli, diploid rokona. Rövid generációs ideje, önbeporzó tulajdonsága, jó transzformációs hatékonysága, valamint a rendelkezésre álló nagyszámú fenotípusos mutáns, a számtalan természetes ökotípus, jó genetikai és fizikai térképezettségéé évtizedek óta a molekuláris biológiai kutatások fontos modellszervezetévé tette. Természetes körülmények között a talaj limitált nitrogén tartalma készleteti szimbiotikus kapcsolat kialakítására a *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) baktériummal. A *M. truncatula* és a *S. meliloti* között kialakuló szimbiotikus kapcsolat alkotja azt a modellrendszert, mely kutatásaink alapvető célpontja (2. ábra).

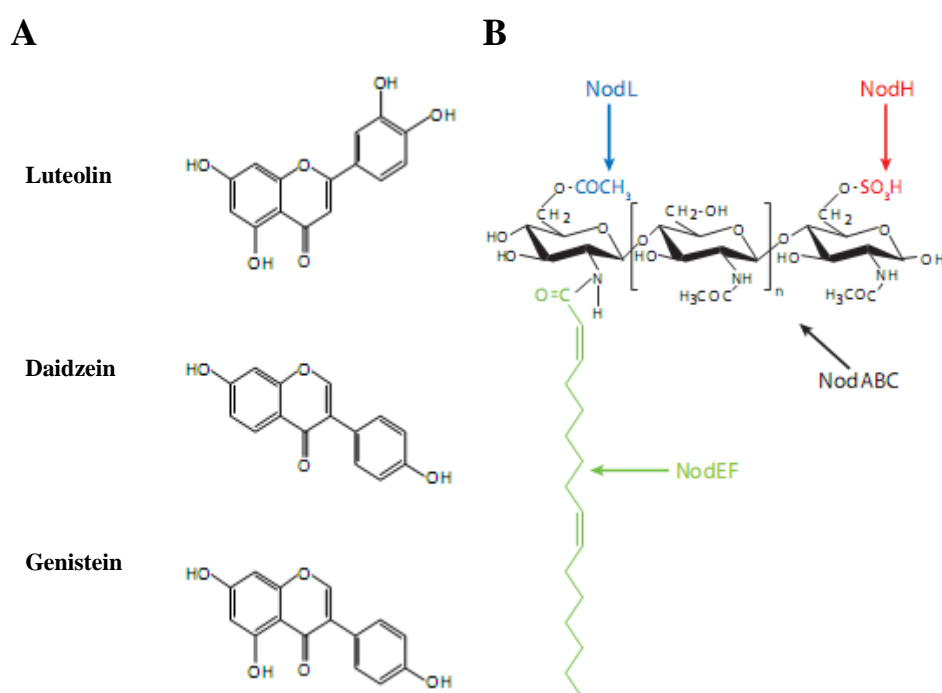


2. ábra. A egymással szimbiotikus kapcsolatra képes két modellorganizmus. *Medicago truncatula* (A) és a vele szimbiotikus kapcsolatra képes baktérium, (B) TA komplet táptalajon, 30°C-on növesztett *Sinorhizobium meliloti* 1021 törzs.

1.2 A szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása

1.2.1. A jelmolekulák szerepe

A *Rhizobiumok* és a pillangósvirágúak közötti szimbiózis nem obligát kapcsolat, hiszen a tápanyagban gazdag talajban a partnerek egymástól függetlenül, önállóan léteznek. Ha azonban a talajban a nitrogén mennyisége elér egy kritikusan alacsony határt, a növény és a baktérium között egy molekuláris párbeszéd játszódik le, melynek következtében megtörténik a kölcsönható partnerek felismerése. A növény gyökeréről a rizoszférába kiválasztott flavonoid-típusú molekulák segítik a szimbiotikus partnerek felismerését, amely bekapcsolja a rhizobiális partner Nod faktorok termeléséért felelős génjeit, megindítva ezzel a bakteriális fertőzéshez és a növényi gyökérgümő kialakulásához vezető folyamatokat (Barnett és Fisher, 2006; Perret és mtsai., 2000).



3. ábra. A szimbiózis kialakulásának kezdeti jelmolekulái. A növény-baktérium közötti szimbiotikus kapcsolat kialakulásának kezdeti jelmolekulái a növényi partner által a rizoszférába bocsájtott flavonoid típusú vegyületek, mint például a luteolin, daidzein és a genistein (A) és a *Rhizobiumok* által termelt Nod factor (B) (Gibson és mtsai., 2008).

A baktériumok által termelt nodulációs (Nod) faktorok már igen kis koncentrációban (10^{-12} M) hatnak a gazdanövény gyökérszörének citoskeletális átrendeződésére, kiváltva ezzel annak pásztorbot szerű görbülését. A Nod faktorok a kortikális sejtek reiniciációja révén

beindítják a növényben a mitotikus folyamatokat, aminek következtében később kialakul a gümőprimordium (Jones és mtsai., 2007). A baktériumokban a *nodABC* operon felelős a lipokito-oligoszaharid molekulák 3-5 kitin oligomerből álló szekezeti vázának létrehozásáért, melyet a többi *nod* gén által meghatározott, különböző funkciós csoportok tesznek variábilissá, egyedivé (3. ábra). A *nod* gének optimális működése a *nodD/nolR* gének által szabályozott, melyeket a talajban található, növényi partner által a rizoszférába kibocsájtott, megfelelő flavonoid típusú molekulák jelenléte vagy hiánya indukál (Broughton és mtsai., 2000; Olah és mtsai., 2001; Perret és mtsai., 2000).

1.2.2. A növényi hormonok szerepe

A szimbiózis kialakulása során számos növényi hormon pozitív és negatív szabályozása optimalizálja a működéshez szükséges megfelelő számú gümő fejlődését (B. J. Ferguson és Mathesius, 2003; Hirsch, 1992; Hirsch és Fang, 1994). A citokinin jelátviteli útvonal a gümőfejlődés korai fázisában, a Nod faktorok érzékelésével egy időben aktiválódik és ahhoz kapcsolódva a belső kortikális sejtek valamint a periciklus sejtek osztódását serkenti. Megfigyelések szerint a citokininek bizonyos körülmények között önmaguk is képesek a gümőképződés folyamatait beindítani (Bauer és mtsai., 1994; delaPena és mtsai., 1997; Murray és mtsai., 2007; Plet és mtsai., 2011) A citokininek a Nod faktorok által kiváltott génexpressziós változásokkal együtt gátolják az auxin poláris transzportját a gyökércsúcs irányába, auxin felhalmozódást okozva a gyökér *Rhizobium* fertőzéssel szembeni oldalán. Habár az auxin szerepe elsősorban a gyökér poláris növekedése és fejlődése tekintetében kiemelkedően fontos, a merisztematikus szövetekhez kapcsolt funkciója miatt a gümőfejlődés szempontjából is elengedhetetlen. Az auxin és a citokininek mellett a gibberelinek és a brasszinoszteroidok is pozitív regulátorai a gümőképződésnek. Ezzel szemben az abszcizinsav, a jázmonsav, az etilén és a szalicilsav gátolják a gümőképződést (Oldroyd és mtsai., 2001). A *M. truncatula* hipernoduláló, azaz a nagyon sok gyökérgümőt létrehozó etilén-érzékeny "sickle" mutánsában (*skl*) éppen az etilén érzékelés hiánya váltja ki a jellemző fenotípust, hiszen az etilén gátló/szabályozó hatása ezekben a mutánsokban nem érvényesül (Prayitno és mtsai., 2006). Az etilén és az abszcizinsav jelenléte a környezeti stresszre adott elsődleges válasz a növény részéről, és a védekezési folyamatok természetes része (Penmetsa és Cook, 1997; J. H. Sun és mtsai., 2006b). A szalicilsav csökkenti a

nodulációs gének expreszióját és gátolja a *Rhizobiumok* növekedését. Az abszcizinsav gátolja az infekció

által kiváltott Ca^{2+} oszcillációt és ezzel az azt követő transzkripciós útvonalakat, ami többek között az *ENOD40* (Early Nodulin40) és *NIN* (Nodule Inception) expressziójának csökkenését is eredményezi (Suzuki és mtsai., 2004). A jázmonsav gátló hatása pedig az etilén útvonalhoz kapcsolódik és kihat például az *ENOD11* (Early Nodulin11) és *RIP1* (peroxidáz gén) transzkripciójára (Biswas és mtsai., 2009; Ding és mtsai., 2008; Kinkema és Gresshoff, 2008; Schultze és Kondorosi, 1998; J. Sun és mtsai., 2006a; Suzuki és mtsai., 2004). A fent említett hormonok által indukált sejtproliferációt az uridin mint sejtosztódási faktor serkenti (Charon és mtsai., 1999; Smit és mtsai., 1995).

1.2.3. A gyökérgümő kialakulása

A sejtfelszíni LysM típusú receptorok MtNFP/LjNFR5 (*M. truncatula* Nod Factor Perception/*L. japonicus*. Nod factor receptor5), MtLYK3/LjNFR1 (Lysin motif receptor-like Kinase3)/*L. japonicus*. Nod factor receptor1) által indukált jelátviteli és transzkripciós változások okozzák a gyökérszőr görbülését és teszik lehetővé az infekciós fonal kialakítását (Arrighi és mtsai., 2006; Limpens és mtsai., 2003). Az MtDMI2/SymRK/MsNORK (*M. truncatula* Doesn't Make Infection2/Symbiotic Receptor-like Kinases/*M. sativa* Nodulation Receptor Kinase) egy receptor-szerű kináz szintén szükséges ezekhez a folyamatokhoz. A Pollux/Castor/DMI1 (Doesn't Make Infection1) kation-csatorna, mely a Nod faktor érzékelését követő Ca^{2+} áramlásban játszik fontos szerepet (Amor és mtsai., 2003; Catoira és mtsai., 2000; Endre és mtsai., 2002; Madsen és mtsai., 2003; Radutoiu és mtsai., 2003; Stracke és mtsai., 2002). A magban található DMI3 (Doesn't Make Infection3) egy kalcium-kalmodulin-függő protein kináz (CCaMk- Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase), amely különböző transzkripciós regulátorokkal együttműködésben indítja be a korai, gümőfejlődéshez szükséges géneket, amilyenek az *ENOD* (Early Nodulin gének) és a *NIN* (Nodule Inception). Ezek együttesen váltják ki a kortikális sejtek osztódását és a szimbiózishoz szükséges transzkripciós útvonalak aktiválását (Catoira és mtsai., 2000; Gleason és mtsai., 2006; Oldroyd és Long, 2003; Tirichine és mtsai., 2006).

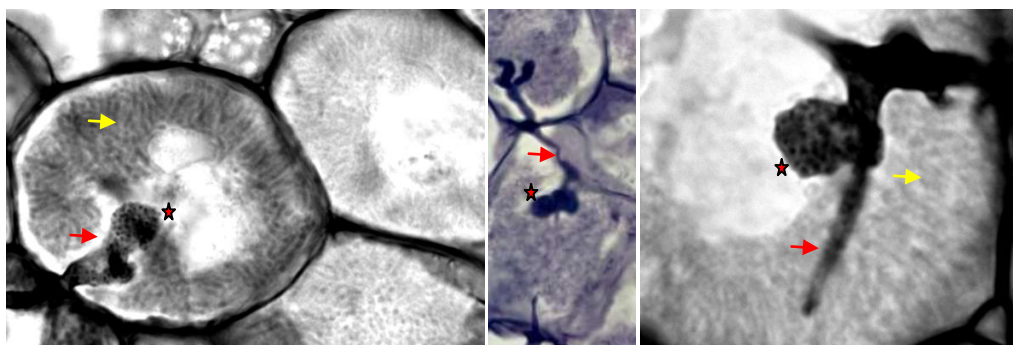
A gyökérszőr felszínén megtapadt baktériumok által termelt Nod faktorok kiváltják a gyökérszőr végének pásztorbot szerű görbülését a sejtek citoszkeletális átrendeződésével, majd a plazmamembrán betűródésével kialakított infekciós fonálon (poliszacharid cső)

keresztül haladnak a gyökérszövet mélyebb rétegeibe, a kortex irányába (Timmers, 2008) (4. ábra).



4. ábra. *M. truncatula* gyökérször morfológiai változása a *S. meliloti* fertőzés (infekció) hatására. A zöld fluoreszcens proteint (GFP) expresszáló bacterium az epidermis sejtek betúródése által kialakított infekciós cső mentén haladnak lefelé, az újonnan képződő gümő irányába. A növényi sejtfa propídium-jodiddal festve (vörös) (Limpens és Bisseling, 2003).

Az infekciós fonal növekedésével egyidőben, a periciklus sejtek és a gyökér kéregsejtjei (belső kortex sejtek indeterminált gümő esetén; külső kortex sejtek determinált gümő esetén) visszanyerik osztódóképességüket és létrehozzák a gümőmerisztémát (Dudley és mtsai., 1987). Amikor a növekvő infekciós fonalak elérik a gümőprimordiumot a baktériumok növényi eredetű peribakteroid membránba csomagolva lefűződnek a növényi sejtekbe, ahol megindul különböző növényi faktorok irányításával a bakteroiddá történő átalakulásuk (5. ábra).



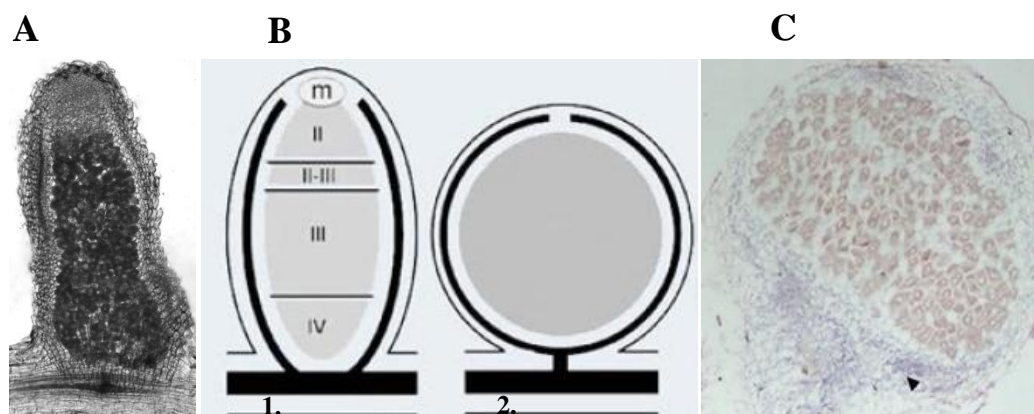
5. ábra *M. truncatula* gyökérgümő sejtjei. A *Rhizobium* baktériumok az infekciós fonálról növényi eredetű membránba csomagolva fűződnek le a gazdanövény sejtjeibe (szimbioszóma). A hatalmas méretű növényi sejtekben a bakteroiddá átalakult *Rhizobium* baktériumok kötik a nitrogént. Infekciós fonál: piros nyíl; infekciós fonál megvastagodás baktériumokkal: piros csillag; bakteroidok a növényi sejtben: sárga nyíl. Beágyazás: Technovit 7100, a metszet vastagsága: 7µm, ZEISS fluoreszcens mikroszkóp, kép 100X-os nagyítás.

A bakteroidok a szimbiotikus gümősejteken belül organellum-szerű struktúráként léteznek és nincsenek közvetlen kapcsolatban a növény citoplazmájával. A szimbioszóma tehát a növényi eredetű peribakteroid membrán a benne található bakteroidokkal.

A funkcióképes nitrogénkötő gümő leghemoglobint tartalmaz. A leghemoglobin a vérfestékhez hasonló szerkezetű vegyület, amely nélkülözhetetlen a gümőben uralkodó alacsony oxigénszint (~2%) stabil fentartásához.

1.3. A gyökérgümők típusai és jellemző szerkezetük

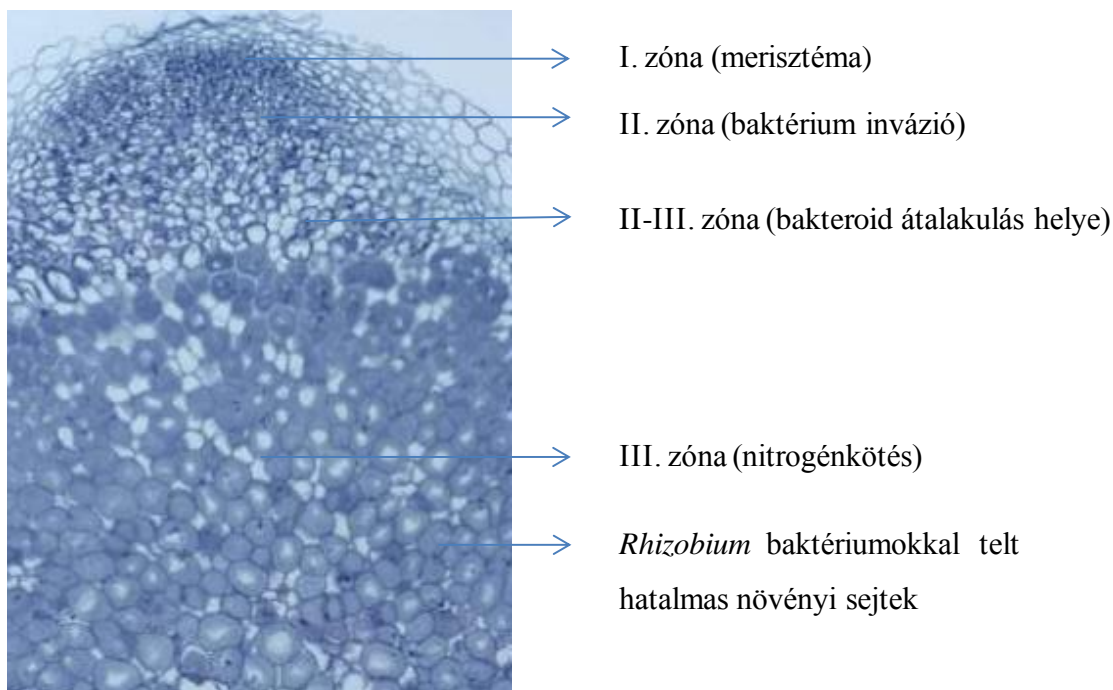
Morfológiai és fejlődéstani szempontból kétféle fő gümő típust különböztetünk meg (Gualtieri és Bisseling, 2000; Hirsch, 1992). Ezek a determinált és indeterminált gümők, melyek között a legszembetűnőbb különbség, a folyamatosan működő merisztéma megléte, vagy annak hiánya (6. ábra).



6. ábra. *M. truncatula* indeterminált típusú nitrogénfixáló gümő (A, B1), és *L. japonicus* determinált típusú nitrogénkötő gümő (B2, C) szerkezeti felépítése. Az indeterminált érett gümő hosszanti irányba megnyúlt alakja a csúcsi részen folyamatosan működő merisztémának köszönhető. A gümő szerkezete jól elkülönülő zónákra tagolható. Az érett, determinált típusú gümőben nincs működő merisztéma, szerkezetileg homogén (egyforma) sejtek alkotják. m: merisztéma; II: infekciós zóna; II-III: átmeneti zóna; III: nitrogénkötő zóna; IV: öregedő zóna.

A determinált gümők általában a trópusi, szubtrópusi növények gyökerein figyelhetők meg, mint például a bab (*Phaseolus vulgaris*), a szója (*Glycine max*) és a kerep (*Lotus japonicus*). Ezekben a gümőkben a merisztéma csak a fejlődés korai szakaszában aktív, de ezt követően viszonylag hamar leáll. A gümőprimordium a külső kortikális sejtréteg osztódásával kezd kialakulni a bakteriális fertőzés felőli oldalán. Az érett, determinált gümő központi szövetét egyforma, hatalmas méretű, poliploid, nitrogénkötő sejtek alkotják (6B2. és 6C.

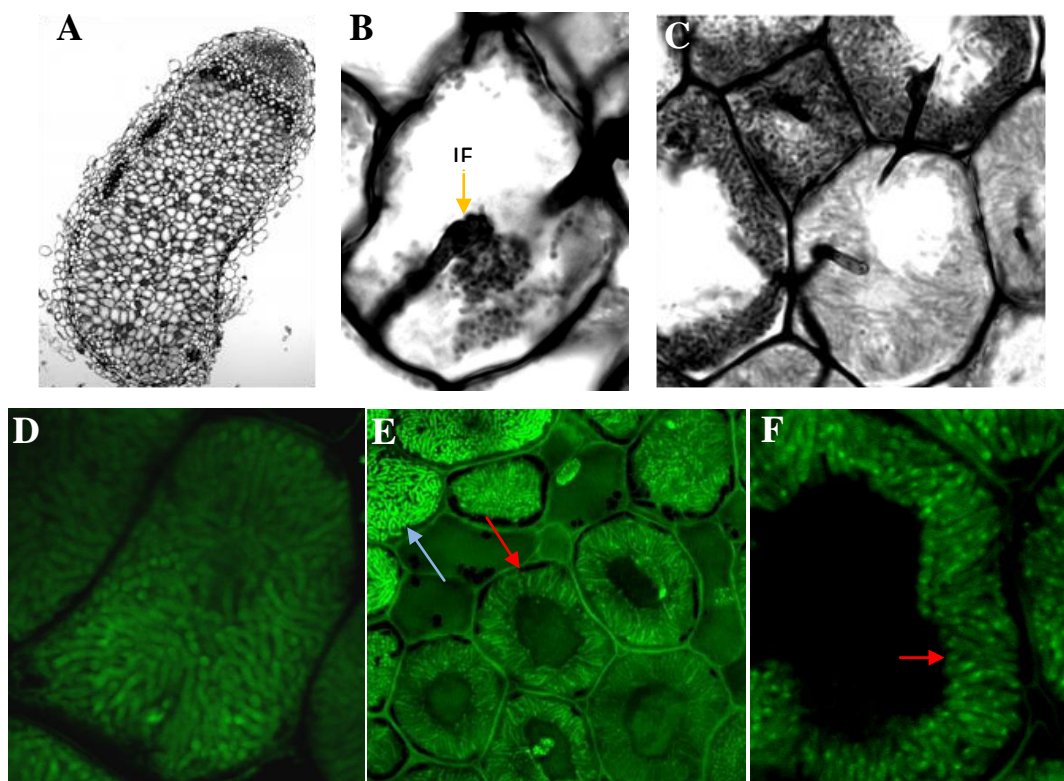
ábra). Az enzimatis úton megkötött nitrogént a bakteroidok ammóniává redukálják, melyet a növények túlnyomórészt ureává átalakítva szállítanak tovább a különböző szövetekbe, a felhasználás helyére (Vance és Gantt, 1992).



7. ábra *S. meliloti* 1021 baktériumtörzssel fertőzött *M. truncatula* (indeterminált) gümő hosszmeteszének részlete. A képen a merisztamatikus (I) zóna, az inváziós (II) zóna, az átmeneti (II-III) zóna és a nitrogénkötő (III) zóna látható. Technovit 7100 beágyazás, metszet vastagsága 7 μ m, Toluidinkék festés, Zeiss fluoreszcens mikroszkóp, 10X-es nagyítás.

Az indeterminált típusú gümőkben a merisztémasejtek nem veszítik el működőképességüket a gümőfejlődés során, így az apikális merisztémáról folyamatosan válnak le új sejtek egész populációi, melyek differenciálódási folyamatok eredményeként hozzák létre a hosszúka alakú, nitrogénkötő gümőt (6. ábra). Az indeterminált gümőkben eltérően a determinált típustól, a fejlődés kezdeti szakaszában képződő gümőprimordiumot a periciklus sejtek és a belső kortikális sejtek osztódása hozza létre. A külső kortikális sejtek mikrotubulusainak átrendeződése a preinfekciós fonál kialakulását eredményezik. A bakteroidok által termelt ammónia a szimbioszóma membrán specifikus csatornáin keresztül jut ki a növényi sejtplazmába. Itt a növény a gümőben rögtön aminosavakká alakítja és aszparaginsav, glutaminsav formájában exportálja tovább a floem szöveiteiben. Az indeterminált gümő típusra jó példa a Galegoid klád (*Astragalega*, *Trifoliae*, *Cicereae*,

Fabeae) számos tagja, köztük a lucerna (*M. sativa*), borsó (*Pisum sativum*), bükköny (*Vicia sp.*), lóhere (*Trifolium repens*) és a *Galega orientalis* (Wojciechowski és mtsai., 2004).



8. ábra *M. truncatula* különböző fejlődési állapotban lévő szimbiotikus gümőjének és gümősejtjeinek hosszmetSZete. (A) Nitrogénfixáló gümő hosszmetSZete. (B) Az infekciós II. zónában történik meg a baktérium invázió - sárga nyíl: infekciós fonál (C, D) Az átmeneti zóna sejtjeiben történik meg a baktériumok morfológiai és funkcionális átalakulása. (E) Az átmeneti zóna rendezetlenül elhelyezkedő bakteroidjai – kék nyíl és a nitrogénkötő zóna sejtjeiben a vakuólum körül rendeződő bakteroidok – piros nyíl. (F) A nitrogénfixáló zóna hatalmas sejtjeiben (poliploid növényi sejtek) több ezer bakteroiddá átalakult *S. meliloti 1021* baktérium látható – piros nyíl. (A) 20µm-es metSZet, 10X-en nagyítás. (B, C) 20µm-es metSZet, 100X-os nagyítás. (D, E, F) Technovit 7100 beágyazás, metSZet vastagsága 7µm, SYTO9 festés, Olympus konfokális pásztázó mikroszkóp. IF: infekciós fonál

Míg a determinált nitrogénkötő gümők homogén szerkezetűek, addig az indeterminált típusú érett gümő felépítése zónákra tagolható (7. ábra) (Vasse és mtsai., 1990). A csúcsi részt az osztódó sejteket tartalmazó merisztematikus (I.) zóna alkotja. Ez alatt található a 10-12 sejtrétegből álló infekciós (II.) zóna, ahol a posztmerisztematikus sejtek differenciálódása zajlik. Ebben a szubmerisztematikus rétegben fűződnek le egy endocitózis-szerű folyamatban a *Rhizobium* baktériumok az infekciós fonálról és csomagolódnak be a növényi eredetű peribakteroid membránba. A 2-3 sejtrétegből álló átmeneti (II-III.) zóna a Galegoid nemzetség tagjainál az amiloplasztok nagyszámú előfordulásával, felhalmozódásával jellemezhető. Itt történik meg a baktériumok legdrasztikusabb alakváltozása, vagyis a végső

bakteroidokká való átalakulás. Ezekben a sejtekben leáll a baktériumok sejtsztódása és kialakul végső, megnyúlt alakjuk és méretük. A gümő terjedelmes és funkcionális részét képezi a nitrogénkötő (III.) zóna, melyben az endoreduplikációval kialakult poliploid növényi sejtek több ezer differenciálódott bakteroiddal teltek (8. ábra). A gümő legöregebb része, az öregedő (IV.) zóna (szeneszcens zóna). Ez a pusztuló bakteroidokat és előregedő növényi sejteket tartalmazza.

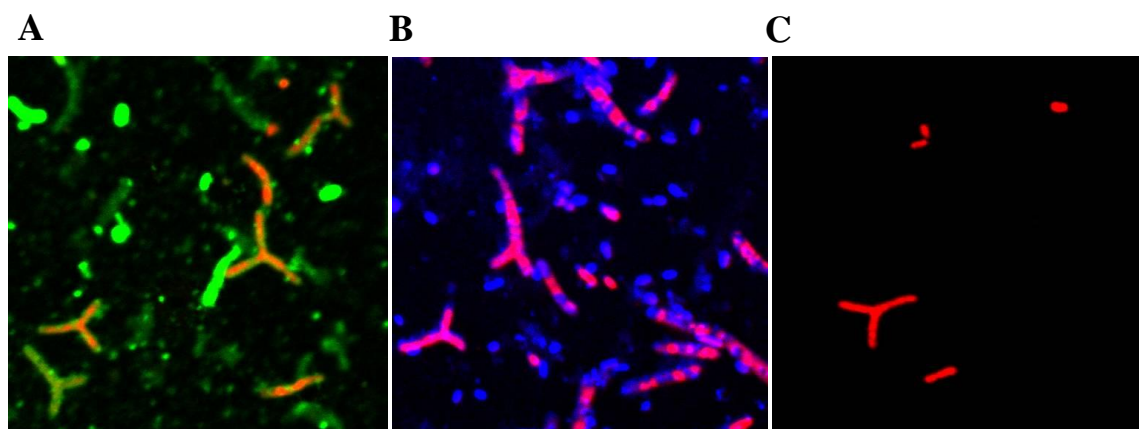
A gyökérgümő típusától függetlenül (determinált, indeterminált) a *Rhizobiumokkal* fertőzött nitrogénkötő sejtek extrém nagy méretűek - akár nyolcvanszor is nagyobbak lehetnek, mint egy normál növényi sejt (Cebolla és mtsai., 1999) - amely az egymást követő endoreduplikációs ciklusok eredménye. Az így keletkező poliploid, 32C-64C gümősejtek (C = haploid DNS tartalom) nagyobb anyagcsere aktivitást tesznek lehetővé mint a diploidok, valamint nagyobb számú (akár több ezer) baktérium befogadására is képesek (Kondorosi és mtsai., 2000). A gazdanövénytől függően a baktériumok alak és élettani változásai azonban nagy különbségeket mutatnak a szimbiotikus kapcsolatok során.

1.4. A bakteroid átalakulás

A Galegoid klád tagjaiban, mint például a lucerna, a borsó és a lóhere, az endoszimbionták egy végső differenciálódáson mennek keresztül, megtartva aktív anyagcseréjüket és a képességet a genom megsokszorozódására, ugyanakkor az egymást követő sejtsztódások elmaradása a DNS tartalom növekedését, poliploiditást, 24 vagy annál is több kópia DNS-t eredményez. A DNS molekulákhoz kötődő DAPI [4',6-diamidino-2-fenilindol] festéssel kimutatták, hogy akár 5-7 nukleoid is található ezekben a bakteroidokban (Mergaert és mtsai., 2006). A bakteroidok növekvő sejttartalma mellett - mely az endoreduplikáció következménye - az alakjuk is jelentősen megváltozik, kialakítva a hosszúság, időnként Y alakban elágazó sejtformát (9. ábra). Átlagosan 5-10 µm hosszúak, vagyis ötször-tízszer nagyobbak az átalakult baktériumok a szabadon élő társaiknál. Az átalakulási folyamat során a baktérium membrán áteresztőképessége jelentősen megnő, melynek következtében több és többféle molekula számára válik könnyedén átjárhatóvá. Az élő sejt megváltozott membrán szerkezetét propidium-jodid (PI) interkaláló fluoreszcens festéssel igazolták. Ez a festék az elhalt vagy nagyobb membrán-permeabilitással rendelkező sejtekben képes a sejtmagi DNS szálba beékelődni. A gümőből izolált bakteroidok közel 50%-a lassan festődik PI-al, miközben azok a CTC (5-cyano-2,3-di-4-tolyl tetrazolium

chloride) légzési aktivitást jelző festéssel igazolhatóan élő, aktív sejtek. A szimbiózis során átalakult baktériumok elveszítik a szaporodó képességüket..

A *Phaseolus vulgaris* (benne *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* baktérium) és a *L. japonicus* (benne *Mesorhizobium loti* baktérium) gümőiből izolált bakteroidok mérete és alakja, valamint DNS tartalma is változatlan volt a szabadon élő baktériumokhoz viszonyítva. Ezek nem mutattak PI festődést, és a növényből izolált baktériumok agar lemezen is képeztek telepeket. Azokban a növényekben, melyek tehát nem a Galegoid klád tagjai, mint például a szója, bab és a kerep, a baktériumok nem kényszerülnek végső (terminális) átalakulási folyamatba a szimbiózis során, így alakjuk, méretük és sejtosztódási képességük a szabadon élőkhöz hasonlóan marad.



9. ábra. *M. truncatula* vad típusú gümőiből izolált *S. meliloti* bakteroidok. Látható a hosszúság, esetenként Y formában elágazó, bakteroid sejtalak. (A) Syto9 (zöld) és PI (piros) festés; (B) DAPI (kék) és PI (piros) festés; (C) hővel előlt bakteroid PI (piros) festés. A Cyto9 és a DAPI festék a nukleinsavat festi és könnyen átjut a sejtek membránján. A PI a halott sejteknek és az élő de nagyobb átérésztő képességű sejteknek a membránján keresztül képes csak a sejtekbe bejutni. Olympus konfokális pásztázó mikroszkóp; 100X-os nagyítás

Azt a feltételezést, amely szerint valamely növényi faktorok felelősek a baktériumok bakteroiddá történő visszafordíthatatlan átalakulásáért, az a megfigyelés is alátámasztotta, hogy ugyanazon *Rhizobium* törzs, mely képes többféle gazdanövényrel szimbiotikus kapcsolatra lépni, (mint például a *Bradyrhizobium* sp. vagy a *R. leguminosarum*) a gazdanövény típusától függően különböző bakteroid differenciációra képes. Mikroszkópos vizsgálatok igazolták, hogy a *R. leguminosarum* bv. *viciae* bakteroidok mérete a Galegoid klád növényeinek indeterminált gümőiben (*Vicia sativa*) jelentősen nagyobb mint a szabadon élő, vagy a nem Galegoid kládba tartozó *Phaseolus vulgaris*ból tisztított bakteroidoké.

A *R. leguminosarum* bv. *viciae* törzs, amely a Galegoid klád egyes fajainak (például bükköny, borsó) mikroszimbiotája, egyik laboratóriumban módosított származéka három

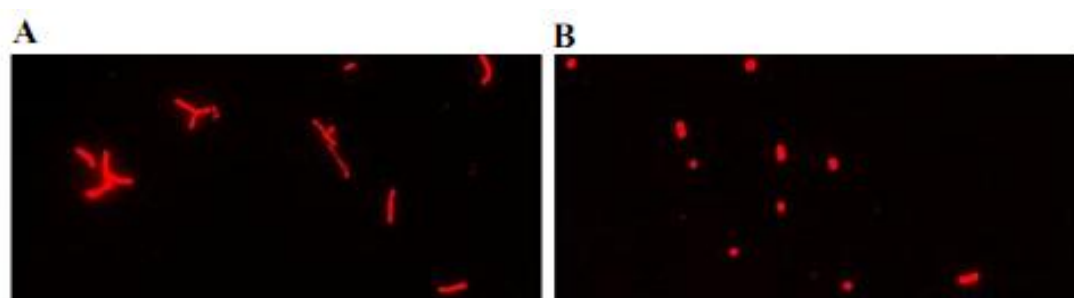
járulékos nodulációs gént (*nodZ*, *nodL*, *nodD*) hordoz, melyekkel flavonoid független módon képes speciális, acetyl- és fukozil-csoportokat hordozó Nod faktorokat szintetizálni. Ezek a Nod faktorok képesek a *Lotus japonicus*-ban a gyökérgümő képződését indukálni. Ezt az extra géneket hordozó törzset *R. leguminosarum* bv. „*Lotus*”-nak nevezték el. A *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (*Phaseolus vulgaris*/bab mikroszimbiotája) laboratóriumi körülmények között módosított változata a *R. leguminosarum* bv. *viciae* törzsből származik és a, pRL1JI elnevezésű szimbiotikus plazmidot hordozza a saját szimbiotikus plazmidja helyett, melynek segítségével képes a borsóval (*Pisum sativum*) szimbiózist létrehozni. A törzs a fentiek mintájára a *R. leguminosarum* bv. „*Pisum*” elnevezést kapta. A *L. japonicus* determinált gümőiből tisztított *R. leguminosarum* bv. „*Lotus*” bakteroidok kicsi méretűek, a PI számára nem átjárható membránnal rendelkeznek és képesek (26%) az izolálást követően telepformálásra szilárd táptalajon, míg a vad típusú *R. leguminosarum* bv. *viciae* a természetes gazdanövényeiből izolálva megnyúlt alakúak, a propidium jodid számára átjárható a membránjuk és nem képesek többé önálló telepformálásra. A Galegoid klád indeterminált típusú gümőiből tisztított, megnyúlt méretű, időnként elágazó formájú *R. leguminosarum* bv. „*Pisum*” bakteroidok membránáteresztő képessége is jelentősen megváltozik, míg a babból tisztított vad típusú formájára ez nem jellemző. Tehát a csaknem izogenikus baktérium törzsek a gazdanövénytől függően különböző fejlődési utat járnak be (Mergaert és mtsai., 2006). Bizonyos növényi faktorok tehetők tehát felelőssé a bakteroid átalakulást kísérő változásokért, melyek a fent említettek alapján jelen vannak a Galegoid klád (*Medicago*, *Pisum*, *Vicia*) tagjaiban, ugyanakkor hiányoznak a nem Galegoid fajokból, mint amilyenek a Robinoid klád növényei (*L. japonicus*, szója, bab) (Wojciechowski és mtsai., 2004).

A terminális bakteroid átalakulásért felelős növényi faktorok legfőbb jellemzői, hogy specifikusak a Galegoid klád fajaira, a baktériumokkal fertőzött gümősejtekben termelődnek, megváltoztatják a bakteriális membrán áteresztő képességét és hatással vannak a sejtsztódásra. Transzkriptóm elemzések során két peptidcsaládot sikerült azonosítani melyek jelen voltak a terminálisan differenciált bakteroidokat tartalmazó *M. truncatula*-ban ugyanakkor hiányoztak a nem-differenciálódott bakteroidokat tartalmazó *L. japonicus*-ból. Ezek a molekulák a gümő-specifikus cisztein-gazdag NCR molekulák, és a glicin-gazdag GRP peptidek voltak (Kevei és mtsai., 2002; Mergaert és mtsai., 2003). Hasonló szekvenciákat találtak a Galegoid kládhoz tartozó *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Galega orientalis* és *Astragalus sinicus* gümő transzkriptómában (Chou és mtsai., 2006; Fruhling és mtsai., 2000; Kaijalainen és mtsai., 2002; Kuster és mtsai., 1995; Scheres és mtsai., 1990;

Schroder és mtsai., 1997), ugyanakkor nem találtak hasonló szekvenciákat a *L. japonicusban* és *G. maxban* sem (Alunni és mtsai., 2007).

Promóter-riporter génfúziós tanulmányok, microarray és *in situ* hibridizációs kísérletek bizonyították, hogy az *NCR* és *GRP* gének a baktériumokkal telt gyökérgümő sejtekben expresszálnak (Maunoury és mtsai., 2010; Mergaert és mtsai., 2003; Nallu és mtsai., 2013). A molekulák szignálpeptid része irányítja a peptideket a szekréción utvonalon át a célpontjukhoz. Az *NCR* molekulák esetében ez az elképzelés hagyma epidermisz sejteken végzett kísérletekben nyert bizonyítást (Mergaert és mtsai., 2003). Az *NCR035-mCherry* fúziós proteinek megjelenése a gümőben átfedést mutatott a bakteroidokkal, jelezve ezzel, hogy a peptidek célpontja a szimbioszóma (Van de Velde és mtsai., 2010).

A kationos *NCR*-ek többnyire a bakteriális membránnal lépnek kapcsolatba, míg az anionos tulajdonságú *NCR001* a baktérium sejtplazmájában volt látható transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken. Több *NCR* molekulát a *M. truncatula* gümőből izolált bakteroid extraktban sikerült kimutatni tömegspektroszkópiás eljárással (Van de Velde és mtsai., 2010).

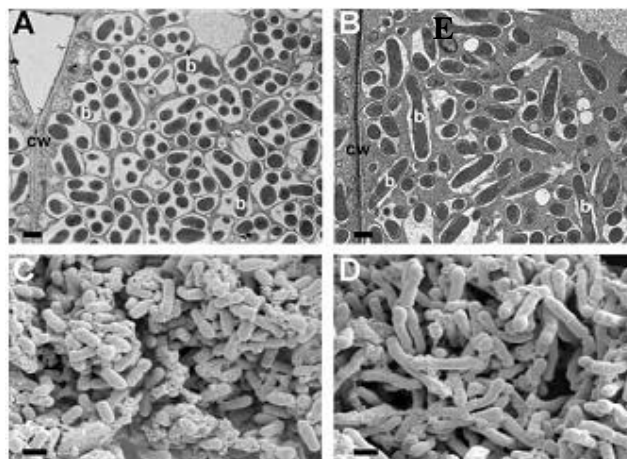


10. ábra Az *NCR* molekuláknak célzott szerepe van a baktériumok átalakulásában. (A) Vad típusú *M. truncatula* gümőből tisztított (hővel elölt) bakteroid PI (piros jel) festés után (B) *M. truncatula dnf1-1* mutánsból izolált (hővel elölt) bakteroid PI festés után. A *M. truncatula dnf1-1* mutánsban nem történik meg a bakteroiddát történő átalakulás.

Működő szekréción utvonala szükséges a növényben ahhoz, hogy az *NCR* molekulák eljussanak a baktériumokhoz a gümőben. A *M. truncatula dnf1-1* (defective in nitrogen fixation) mutáns a szekréción utvonala gümő specifikus szignál peptidáz komplexében (SPC) hibás. Az SPC az endoplazmatikus retikulumban (ER) található és a szignálpeptid eltávolítását végzi az átíródo fehérjékről (*NCR*, *GRP*, *SNARP*, stb.), miközben a fehérje az ER lumenébe áthelyeződik. Az *Mtdnf1-1* mutánsban rendesen képződik az infekciós fonál a fertőzést követően, amiről a baktériumok lefűződnak a növényi sejtekbe, a növény mégis nitrogén fixációra képtelen (*fix-*) gümőket hoz létre, melyekben a fertőzést követően elmarad

a bakteroid átalakulás. A *Mtdnf1-1* mutánsban az NCR001 peptid immunfluoreszcens vizsgálata alapján elhelyezkedése átfed az endoplazmatikus retikulummal, de az NCR molekula a le nem hasított szignálpeptid miatt nem érte el célját, a bakteroidot, így annak valódi bakteroiddá történő átalakulása sem következett be (10. ábra). Mindez azt bizonyítja, hogy a bakteroidok és az NCR molekulák közvetlen kapcsolata szükséges az átalakuláshoz, továbbá, hogy az NCR-ek (és lehet, hogy a GRP-k is) azok a növényi faktorok amelyek a terminális bakteroid átalakulásért felelősek.

A hipotézist, mely szerint az NCR-ek irányítják a bakteroidok terminális átalakulását, a *L. japonicusban* végzett expressziós kísérletek is alátámasztották. Kontrollként *M. truncatula* leghemoglobin-1 promóterrel (*pMtLb1*) β -glükuronidázt (GUS) termeltettek transzgénikus *L. japonicus* gümőben és a vad típusra jellemző nem-differenciálódott bakteroid morfológiát figyeltek meg a szimbioszómában. A *pMtLb1::NCR035*-öt expresszáló *L. japonicus* gümőben ezzel szemben megjelentek a hosszúkás alakú bakteroidok (11. ábra) (Van de Velde és mtsai., 2010). Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az NCR peptid előidézhetik a bakteroid átalakulását a nem-Galegoid kláddhoz tartozó fajokban is, mint ahogy láttuk a *L. japonicusban*. Az NCR peptid tehát ahogy *in vitro* és *in vivo* kísérletek is alátámasztják, azok a növényi faktorok, melyek felelősek a bakteroidok terminális átalakulásáért.



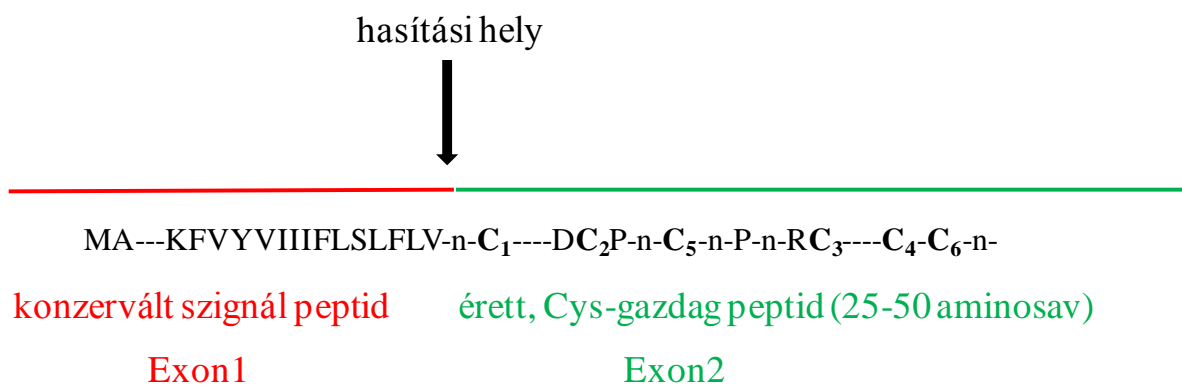
11. ábra A nem-Galegoid kládba tartozó *L. japonicusban* az NCR gének expressziója beindítja a kládra nem jellemző bakteroid differenciációt. (A) kontroll, GUS-t termelő szimbiotikus gümősejt/TEM, (B) NCR035-öt termelő szimbiotikus gümősejt/TEM, (C) kontroll, nem differenciálódó bakteroidok GUS-t expresszáló gümőben/SEM, (D) megnyúlt alakú bakteroidok az NCR035-öt termelő *L. japonicus* sejtekben/SEM.

A *R. leguminosarum* A34 baktérium törzs a borsóban ötször nagyobb tömegű gümőt képes létrehozni, mint a babban. A *Bradyrhizobium* sp. 32H1 baktérium törzs esetében pedig a

hajtás és gyökér szárazanyag tartalma a gümő szárazanyag tartalmára vonatkoztatva háromszor több volt a mogyoróban, mint a kínai babban (*Vigna unguiculata*). Az indeterminált típusú gümőkben ahogy a borsóban és a mogyoróban is a CO₂ felvételre vonatkoztatott nitrogénáz aktivitás szignifikánsan nagyobb érték volt mint a determinált gümőkben, például a babban és a *V. unguiculataban* (Oono és Denison, 2010). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a terminális átalakulást indukáló növények gümőiben az átalakult bakteroidok hatékonyabb nitrogénkötést képesek végezni.

1.5. Az NCR géncsalád jellemzése

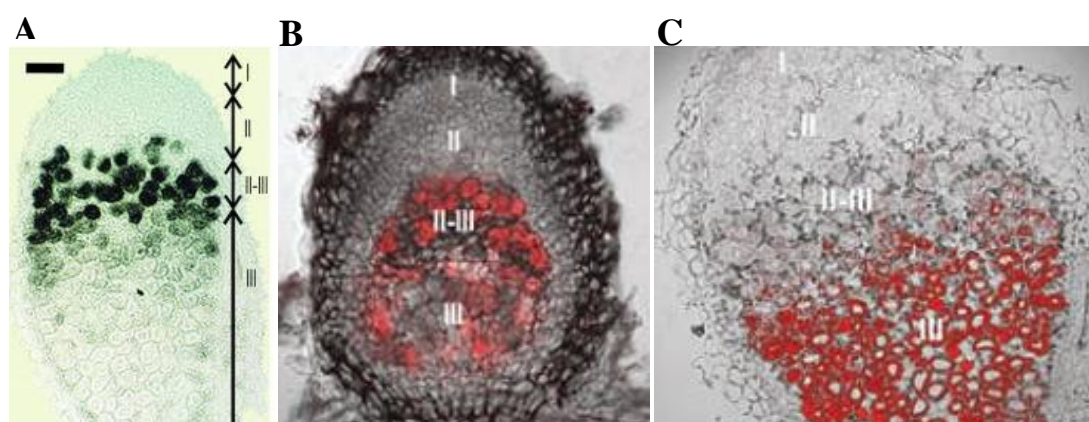
A kezdetben mintegy 300 tagot számláló *M. truncatula* NCR család napjainkra közel 600 azonosított peptidet tartalmaz (Mergaert és mtsai., 2003). Az érett, szekretált peptidok 25-50 aminosav hosszúak és 2-3 diszulfid hidat tartalmaznak. A viszonylag konzervált szerkezetű szignál peptidet kódoló N-terminális rész irányítja a peptid szállítását a citoplazma membránon keresztül. A molekula rendkívül variábilis aminosav összetételű, C-terminális, aktív része, négy-hat konzervált elhelyezkedésű cisztein motívumot tartalmaz (12. ábra).



12. ábra Az NCR géncsalád sematikus szerkezete (Mergaert és mtsai., 2003). Az NCR molekulák két exonból állnak. Az első exon egy konzervált szerkezetű szignálpeptidet, a második exon pedig a négy-hat ciszteint (Cys) tartalmazó, érett peptidet kódolja. A molekula C-terminális része, a konzervált szakaszok ellenére rendkívül variábilis.

M. truncatula NCR gének nagy számban fordulnak elő a 8-as kromoszómán (Thoquet és mtsai., 2002) de elszórta, gyakran csoportokat alkotva minden kromoszómán megtalálhatók (Alunni és mtsai., 2007).

Az egyes NCR géneknek a gümőfejlődés során rájuk jellemző tér és időbeni kifejeződési mintázata van. A fiatal gümő fejlődése során először megjelenő NCR-ek már körülbelül 3 nappal a bakteriális fertőzést követően gyenge expressziót mutatnak, amely a negyedik napon már szignifikánsan magasabb. 40 nappal a fertőzés után, mikorra megjelenik az előregedő (IV.) zóna, már közel 530 darab különféle NCR gén működése mutatható ki (Nallu és mtsai., 2013).



13. ábra Az NCR peptidek térbeli kifejeződése transzgenikus *M. truncatula* gümőkben. (A) *M. truncatula* gümő hosszszelvény, hibridizáció *NCR084* ellenanyaggal. (B) *NCR035-mCHERRY* (piros jel) expresszió az átmeneti (II-III.) és a nitrogénkötő (III.) zónában. (C) Immunofluoreszcens lokalizációja az *NCR001*-nek a gümő nitrogénkötő (III.) zónájában, Alexa633 (piros jel) (Mergaert és mtsai., 2003; Nallu és mtsai., 2013; Van de Velde és mtsai., 2010).

Az egyes NCR molekulák kifejeződési mintázatuk alapján két nagy, korai és késői kifejeződésű csoportba sorolhatók. A korai NCR-ek a gümő fejlődésének kezdeti szakaszától, tehát a *Rhizobium* fertőzést követően 3-4 nappal, az érett, bakteroidokkal rendelkező nirtogénfixáló gümő létrejöttéig (14 nappal fertőzést követően) mutatnak magas génműködést (Nallu és mtsai., 2013). Ebbe a csoportba tartozik például az *NCR025*, *NCR121*, *NCR192*, *NCR209* és az *NCR454*. Szintén korai géneknek tekinthetők a fertőzést követő hetedik napon megjelenő *NCR053*, *NCR084*, *NCR094* és az *NCR096*. A gének egy csoportja későbbi időpontban kezd megnyilvánulni, de már a 10 napos gümőben igen magas értéket mutat. Ilyen gén például az *NCR007*. A késői expressziót mutató NCR gének az érett, körülbelül 14 napos

gümőben kezdenek aktív működésbe, például az NCR299, NCR304, NCR319 és az NCR410 (mtgea.noble.org/v3/).

Az NCR molekulák térbeli kifejeződését promóter-riporter gén fúziók és *in situ* hibridizációs technikák segítségével határozták meg (13. ábra). A kísérletek eredményei alapján az NCR-ek fő megnyilvánulási területe az interzóna (II-III. zóna), ahol a legdrasztikusabb bakteroid átalakulás zajlik és a nitrogén-fixáló zóna (III. zóna).

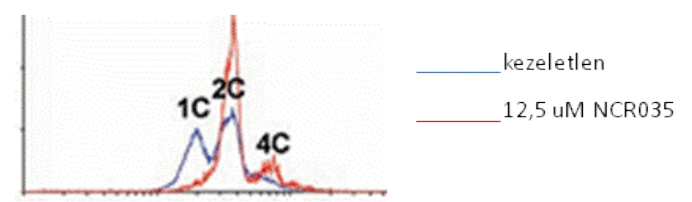
A *M. truncatula* genomban kódolt közel 600 NCR peptid igen változatos aminosav összetétellel és izoelektromos ponttal (pI 3,2-11,25) jellemzhető. A pI szerinti csoportosítás megkülönböztet anionos (pI 6>), kationos (pI 8<) és neutrális (pI 6-8) típusú peptideket. Az azonosított NCR molekulák 40%-a savas (például az NCR214, NCR215, NCR167, NCR168), 36%-a bázikus jellegű (például az NCR335, NCR247) és a peptidek csupán 24%-a neutrális (például NCR293) tulajdonságú.

1.6. Az NCR molekulák feltételezett szerepe

Az NCR géncsalád tagjainak számos szerepe lehet a bakteroid differenciáció során. A csoport bizonyos tagjainak összehangolt feladata lehet a bakteroid/gümő fejlődés különböző állapotainál. A természetben általában csak egy vagy legfeljebb néhány fehérje feladata egy bizonyos biokémiai funkció ellátása. A nagy protein családok egyes tagjainak is egyedi sajátosságai lehetnek, így például a különböző receptor családokban, ahol a közeli rokon polipeptidek különbséget tesznek az eltérő, specifikus jelek között. Elképzelhető az is, hogy az NCR család tagjai sem köthetőek csupán egyetlen funkcióhoz, sokkal valószínűbb, hogy az egyes tagoknak különböző feladataik lehetnek a bakteroid differenciáció során. Ezt az elképzelést alátámaszthatja a peptidek térben és időben eltérő/egyedi expressziós megjelenése a gümő különböző fejlődési állapotainál. Egyesek a II. zóna mások a II-III. vagy a III. zóna sejteiben termelődnek, vagy korai/kései expressziót mutatnak a gümő fejlődése során.

Az NCR molekulák legjelentősebb funkciója talán a bakteriális sejtosztódás gátlása, folyamatos DNS replikáció mellett. Ismert ugyanis, hogy a terminálisan differenciálódott bakteroid sejtek magas DNS tartalommal rendelkeznek. Az NCR-ek sejtciklushoz kapcsolódó hatását áramlási citometriával igazolták. Az NCR035 peptiddel kezelt sejtekben négyszeres DNS tartalmat mértek (13. ábra). A peptid tehát míg a DNS szintézist nem gátolta, addig a sejt természetes osztódását negatívan befolyásolta (Van de Velde és mtsai., 2010).

Egyesek peptidek gátolhatják az osztódási síkban a Z-gyűrű kialakítását eredményező monomerek kapcsolódását. Más peptidek felelősek lehetnek a szimbioszómában zajló endoreduplikációs ciklus fenntartásáért mindaddig, míg a bakteroidok eléri végső méretüket. A peptidek egy csoportja megváltoztatja a bakteriális membrán szerkezetét, annak permeabilitását, ahogy azt a Galegoid klád növényeinek gümőiből izolált bakteroidokon tapasztalhatjuk. Ezeknek jelentősége lehet a növényi sejtek és a bakteroidok közötti tápanyag cserében, továbbá az NCR molekulák intracelluláris célpontjainak elérésében. A III. zónában képződő NCR peptidek egyes elképzelések szerint szabályozhatják a gümőből származó szénforrás nitrogén-kötésre történő szigorú felhasználását.



13. ábra Az *S. meliloti* baktérium változó DNS tartalmának alakulása áramlási citometriával (flow cytometria). Az NCR035 peptidkezelést követően mérhető az *S. meliloti* növekvő DNS tartalma (Van de Velde és mtsai., 2010).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évek során hatalmas tudástár halmozódott fel a növény-mikróba szimbiotikus kapcsolat kutatásaiból, bár ezzel egy időben rengeteg megválaszolatlan, kérdés is született. Csoportunk egy francia munkacsoporttal (CNRS, Institut des Sciences du Végétal) együttműködve megállapította, hogy a növényi szimbiotikus partner által a *Rhizobiumok* jelenlétében termelt AMP-szerű, gümő-specifikus cisztein-gazdag peptidek (NCR) fontos szerepet játszanak a gümőben a baktériumok bakteroiddá történő átalakulási folyamataiban (Van de Velde és mtsai., 2010). A *Rhizobiumokkal* fertőzött gümősejtekben termelődő NCR-ek csökkentik a bakteriális membrán sértetlenségét és sejtosztódási képességét, ugyanakkor nem gátolják a DNS replikációt. Az AMP típusú molekulákról tudjuk, hogy főleg a membránban fejtik ki romboló hatásukat, de jelenleg nem tisztázott, hogy vajon az NCR-ek is hasonlóan működnek-e. Bár kutatásaink során az NCR peptidekkel kapcsolatban igen sok mindenre fény derült, például a peptidek felépítésére, rendszertani előfordulásukra, behatárolható időbeli megjelenésükre a gümő fejlődése során, valamint a bakteroid átalakuláshoz nélkülözhetetlen szerepükre, mégis rengeteg kérdés megválaszolatlan maradt.

A kutatócsoportunkban folyó munkáknak két fő iránya van:

1. Egyrészt célunk

- a két partner közötti kommunikáció molekuláris szintű megismerése,
- a szimbiózisban résztvevő gének jellemzése és funkciójuk meghatározása,
- az NCR molekulák pontos szerepének felderítése a szimbiózisban,
- megtalálni elsődleges kölcsönható partnereiket, illetve intracelluláris célpontjaikat a baktérium sejtekben.

2. Másrészt megpróbáljuk kideríteni, hogy

- a defenzin-szerű NCR molekulák rendelkeznek-e antimikrobiális hatással,
- felhasználhatók-e a humán- és állatgyógyászatban, növényvédelemben, illetve az élelmiszeriparban.

Ezen általános célok megvalósítása során a dolgozatomban bemutatott munka céljai a következők voltak:

1. Tizennégy különböző izoelektromos ponttal (pI) rendelkező (anionos, neutrális és kationos típusú) NCR peptid hatásának vizsgálata *S. meliloti*1021 szabadon élő baktérium kultúráján.
2. A legrövidebb és eddig a leginkább tanulmányozott NCR247, valamint a legkationosabb NCR335 peptid részletesebb vizsgálata:
 - Az antimikrobiális hatás tanulmányozása egyéb, nem *Rhizobium* baktériumokon: Gram-negatív, Gram-pozitív, emberi/állati és növényi patogéneken.
 - A *S. meliloti* 1021 törzs teljes, expresszált genom szintű vizsgálata a két NCR peptid hatására, új-generációs szekvenálási technika (NGS) alkalmazásával, s ezzel az NCR-ek által kiváltott génexpressziós változások felderítése és annak tisztázása, hogy mik lehetnek a sejt korai válaszai az NCR kezelésekre.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Felhasznált baktérium törzsek és *in vitro* növekedési körülményeik

3.1.1.1. Az *S. meliloti* 1021 törzs *in vitro* növekedési körülményei

A *M. truncatula* nitrogénkötő gümőiben termelődő NCR molekulák *ex planta* hatásvizsgálatához a lucerna növény természetes körülmények között előforduló egyik szimbiotikus partnerét, az *S. meliloti* 1021 törzset választottuk. A baktérium növesztéséhez módosított folyékony LSM (Low Salt Medium) tápot használtunk. (Liang és mtsai, 2001, módosított az 1A. függelék szerint)

3.1.1.2. Patogén és nem patogén törzsek vizsgálata

Az alábbi Gram-negatív, Gram-pozitív, patogén és nem patogén törzsek folyékony LB tápoldatban, lettek felnövesztve: *Listeria monocytogenes*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Pseudomonas syringae* 30 °C-on, míg az *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* és *Bacillus cereus* 37 °C-on.

3.1.2. Az NCR peptidek

Az *S. meliloti* 1021 törzs NCR molekulákkal történő kezeléséhez nagy tisztaságú (> 95%) NCR peptideket szintetizáltattunk (Proteogenics France).

NCR335 (64 aminosav), pI 11,22

RLNTTFRPLNFKMLRFWGQNRNIMKHRGQKVHFSLLSDCKTNKDCPKLRRANVRC
RKS YCVPI

NCR247 (24 aminosav), pI 10,15

RNGCIVDPRCPYQQCRRPLYCRRR

NCR137 (35 aminosav), pI 9,7

MTLRPCLTDKDCPRMPPHNIKCRKGHCVPIGKPFK

NCR192 (33 aminosav), pI 9,54

MKNGCKHTGHCPKMCYAKTTKCRNNKCQCVQL

NCR035 (35 aminosav), pI 9,42

SFLGTFISSCKRDKDCPKLYGANFRRCRKGTCVPPI

NCR055 (43 aminosav), pI 9,21

VNDCIRIHCKDDFDCIENRLQVGCRLQREKPRCVNLVCRCLRR

NCR057 (42 aminosav), pI 8, 43

RPVSKDHYDCRRKVKIVGCIFPQEKPMCINSMCTCIREIVP

NCR084 (42 aminosav) pI 6,71

FATGMPCKTDKECPNTSTHKYKCINDDCFYIYWPLGNSLV

NCR229 (49 aminosav), pI 6,55

QKDLKVFTCQRDEDCKVACATYGGDPWCFRNVCCKHYNEGGLHAELH

NCR224 (34 aminosav), pI 4,65

KDLPFNICEKDEDCLEFCAHDKVAKCMLNICFCF

NCR235 (38 aminosav), pI 4,53

DTDPFAFCIKDSNCGQDLCTSPNEVPECRLKQCIKS

NCR051 (41 aminosav), pI 4,14

EEDIGGHLECVEDDCMEESCPIFSVHKCKNSGCECEMFR

NCR095 (33 aminosav), pI 3,62

ELVCDTDDDCLKFFPDNPYPMECINSICLSLTD

NCR168 (41 aminosav), pI 3,61

YPFQECKVDADCPTVCTLPGCPDICSFPDVPTCIDNNCFCT

3.2. Módszerek

3.2.1. NCR peptidek *in vitro* aktivitás vizsgálata

Az $OD_{600}=0,1$ -ig növesztett patogén és nem patogén baktériumokat centrifugálást követően azonos mennyiségű, 10mM Kálium-foszfát (PH=7) pufferben vettük vissza, majd ezt követően kezeltük 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú NCR peptidekkel 3 órán keresztül. A peptid kezeléseket hatásukat CFU tesztben hasonlítottuk össze.

A transzkriptom vizsgálatok körülményeinek beállításához LSM folyékony tápoldatban 30°C-on éjszakán át növesztett *S. meliloti* „starter” sejt kultúrát $OD_{600}=0,01$ -re hígítottuk. Az $OD_{600}=0,1$ -ig növesztett baktériumokat kezeltük NCR peptidekkel 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ és 50 $\mu\text{g/ml}$ végtérfogatra számított koncentrációban, 10 perc, 30 perc és 120 perces időtartamokig.

3.2.1.1. Kolóniát formáló sejtek számának meghatározása, CFU teszt

A CFU (Colony Forming Units) teszt egy kitenyésztéses módszer, a kolóniát formáló sejtek számának meghatározásához. A különböző ($OD_{600}=0,1$) baktérium sejtekből az NCR247 és NCR335 peptidekkel történő kezelést követően hígítási sorokat készítettünk (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} és 10^{-4}), majd 0,1 ml baktérium kultúrát szilárd TA (Maniatis és mtsai, 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual) lemezekre szélesztettük. Két napos, 30°C-os inkubálást követően számoltuk a telepek számát. A kísérlet során három biológiai párhuzamos CFU eredményeit vettük figyelembe, melyek között szórást számítottunk, ezeket a megfelelő grafikonokon feltüntettük.

3.2.1.2. A propidium-jodid (PI) teszt

A PI egy DNS interkaláló, fluoreszcens festék, mely csak a sérült membránon át képes a sejtbe bejutni. Az éjszakán át növesztett induló vagy „starter” *S. meliloti 1021* sejt kultúrát $OD_{600}=0,01$ -re kihígítva növesztettük LSM folyékony tápoldatban 30°C-on, $OD_{600}=0,1$ -ig, majd a logaritmus növekedési fázisú baktériumot 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, és 50 $\mu\text{g/ml}$

végkoncentrációban kezeltük NCR247, illetve NCR335 peptidekkel 10, 30 és 120 percen keresztül. A kezelt kultúrához 5µg/ml propidium-jodid hozzáadásával 530 nm excitációs és 600nm emissziós hullámhossznál folyamatosan mértük a fluoreszcencia intenzitás változást ABI/FLUOstar OPTIMA típusú fluorométeren.

3.2.2. Az RNS minták készítése

A szekvenáláshoz *S. meliloti 1021* önálló telepekből kiindulva három biológiai párhuzamost növesztettünk. Az LSM folyékony tápoldatban 30°C-on növesztett „starter” kultúrákat 40-40 ml végtérfogatra hígítottuk. Nyolc óra inkubálást követően a 40 ml log fázisú sejt kultúrát OD₆₀₀=0,01-re hígítottuk 400 ml végtérfogatban, majd OD₆₀₀=0,1-ig növesztettük (Növekedési görbe LSM tápoldatban 1B. függelék). A három párhuzamos növesztésből 40-40 ml baktériumot kezeltünk 10 µg/ml végkoncentrációra számított NCR247, illetve NCR335 peptidekkel. A kezeléseket követően, teljes RNS-t izoláltunk RiboPure Bacteria Kit (Ambion) használatával. A mintánkban maradt DNS eltávolítása RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA) enzimmel történt.

3.2.3. Az RNS minták minőségi és mennyiségi ellenőrzése

Az RNS mintáink minőségének és mennyiségének korrekt meghatározásához Agilent 2100 típusú Bioanalyzert használtunk (14. függelék).

3.2.4. Az RNS minták előkészítése szekvenáláshoz

A megfelelő minőségű RNS minták szekvenáláshoz való előkészítése során a szekvenáló készüléket gyártó cég (ABI) által javasolt protokoll szerint jártunk el.

- A kezelésként három biológiai párhuzamosból tisztított RNS minták egy részét egyesítettük, azaz „poolokat” készítettünk, másik felét megtartottuk az ellenőrzési kísérletekhez.

- A totál RNS minták jelentős, akár 90%-át kitevő rRNS tartalom eltávolításához Gram negatív baktériumokra fejlesztett kitet alkalmaztunk (Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit, Epicentre Illumina Company).
- Ezt követte a minták fragmentálása RNáz-III emésztéssel (37 °C, 10 perc).
- A P1 és P2 adaptor fragmentek ligálása és a vonalkódolás (egy éjszakán át, 16 °C), (3. táblázat).
- A cDNS könyvtár előállítására reverz transzkripcióval.
- A minták méret szerinti szelektálása (150-250 nukleotid) 6% TBE-Urea gélen, 1x TBE pufferben
- A cDNS könyvtár felszorzása (TaqMan próba).
- Mintánként 8 pM DNS szekvenálása.

A

| | Kezeletlen kontrol | NCR247 10µg/ml | NCR335 10 µg/ml |
|-------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| 10 perces kezelés | 1. minta | 2. minta | 3. minta |
| 30 perces kezelés | 4. minta | 5. minta | 6. minta |

B

| Adaptor és vonalkód szekvenciák | | |
|---------------------------------|---------------|---|
| ADAPTOR | P1 | 5' -ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGTT-3' 5' -CCTCTCTATGGGCAATCGGTGAT-3' |
| | P2 | 5' -AGAGAATGAGGAACCCGGGGCAGTT-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCT-3' |
| VONALKÓD | BC001/1.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGTGTAAGAGGCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |
| | BC004/2.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGGATGCGGTCCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |
| | BC008/3.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGAGCGAGGATCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |
| | BC010/4.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGCGGTAAGCTCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |
| | BC011/5.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGTGCGACAAGCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |
| | BC013/6.minta | 5' -CGCCTTGGCCGTAACAGCAG-3' 5' -CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTGCGGTAAGGCCTGCTGTACGGCCAAGGCG-3' |

3. táblázat A kísérlet során alkalmazott kezelések és az egyes minták kémiai megkülönböztetése. A, A kísérletben használt kezeletlen és kezelt minták száma, a kezelési időkhöz feltüntetésével. Valamennyi kezeléskor három biológiai párhuzamot alkalmaztunk B, A táblázat a cDNS könyvtár készítéséhez és a szekvenáláshoz használt adaptor szekvenciákat, valamint az RNS minták kémiai megkülönböztetéséhez használt vonalkód szekvenciákat tartalmazza.

3.2.5. Az RNS minták szekvenálása

A szekvenáláshoz előkészített bakteriális RNS mintáink végső feldolgozása Solid4 (ABI Life Technologies) típusú új-generációs szekvenáló készüléken történt (BAYGEN Intézet), a gyártó cég által javasolt protokoll szerint. A rendszer „color space”, azaz színkódos technológiát alkalmaz, amely nem egyedi nukleotidokat, hanem nukleotid párokat olvas le, vagyis minden egyes szín két nukleotidnak felel meg, s minden nukleotidot kétszer, két nukleotid párral vizsgál. Ezzel a módszerrel jóval pontosabb szekvencia meghatározásra van lehetőségünk, mint a hagyományos eljárásokkal, mivel egyértelműen elkülöníthetőek a leolvasásból származó szekvenálási hibák.

3.2.6. Az adatok bioinformatikai feldolgozása

3.2.6.1. A szekvenálási adatok visszatérképezése referencia genomhoz

A szekvenálás során kapott átlagosan 50 nukleotid hosszúságú leolvasási egységeket CLC Genomics Workbench 5.1 szoftver használatával térképeztük vissza az NCBI akkor elérhető legfrissebb *S. meliloti 1021* referencia szekvenciájához.

Az NCBI-ből letöltött referencia szekvenciák a legutolsó frissítések dátumával:

- [NC_003037](#) publikálva (Barnett és mtsai., 2001)
utolsó frissítés dátuma: 2012 január 21.
törzs: *Sinorhizobium meliloti 1021*
cirkuláris genomegység: pSymA plazmid (1-1354226 bp)
- [NC_003047](#) publikálva (Capela és mtsai., 2001)
utolsó frissítés dátuma: 2011 október 28.
törzs: *Sinorhizobium meliloti 1021*
cirkuláris genomegység: teljes genom (1-3654135 bp)
- [NC_003078](#) publikálva (Finan és mtsai., 2001)
utolsó frissítés dátuma: 2011 szeptember 15
törzs: *Sinorhizobium meliloti 1021*
cirkuláris genomegység: pSymB plazmid (1-1683333 bp)

A visszatérképezés során alkalmazott beállítások:

- Maximum number of mismatches (short reads) = 2
- Organism type = Prokaryote
- Unspecific match limit = 10
- Minimum length fraction (long reads) = 0.5 (minimum 25bp)
- Minimum similarity fraction (long reads) = 0.8 (minimum 80% egyezés)
- Expression value = Read Per Kilobase of exon Model value (RPKM)

3.2.6.2. A szekvenálási adatok normalizálása

A manapság alkalmazott legjobb minőségű előregyártott molekuláris eszközök használata sem teszi lehetővé a tökéletes rRNS kivonást a rendszerből. Ennek az a következménye, hogy a leolvasott DNS fragmentek egy része számunkra értéktelen információt hordoz. Ezek végleges eltávolítására bioinformatikai úton van lehetőségünk. Az rRNS szekvenciák mellett a tRNS-t és transzpozonokat kódoló szekvenciákat is elkülönítettük. Továbbá valamennyi kezelt mintára vonatkozóan eltávolítottuk azokat a géneket, amelyek alacsony fragment számmal ($10 \geq$) voltak jelen a mintáinkban. Az adatok könnyebb feldolgozását segítette, hogy a leolvasásokat 1:1 millió-ra vonatkoztattuk (leolvasott egységek száma/1 millió leolvasott egység száma), amit 1 kb-nyi génhosszra vonatkoztattunk, hogy elkerüljük a gének hosszából adódó különbségeket (RPKM).

3.2.6.3. Az adatok kiértékeléséhez használt programok

A szekvenálásból kapott eredményeknél szignifikáns különbségnek a kontrollhoz viszonyított minimum kétszeres génexpressziós változást vettük. Ezt a kétszeres, vagy azt meghaladó különbséget elért géneket használtuk a különböző programok segítségével a további analízisekben.

Az alábbi programokkal és internetes elérhetőségekkel végeztük az adatfeldolgozást:

- <http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase> (*S. meliloti 1021* genom analízis)
- <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi> (venn diagram generátor)

- <http://string-db.org/> (funkcionális fehérje asszociációs hálózatok keresése)
- DAVID Bioinformatics Resources 6.7 2003-2013 (gén annotációs adatbázis)
- <http://www.genome.jp/kegg/> (KEGG analízis)
- Transcript Analysis Ver2 (gén expressziós adatkezelő program)

3.2.7. A szekvenálás megerősítése RT-PCR reakcióval

A valós idejű Real-Time PCR-készülékekben amplifikációs görbék segítségével ciklusról ciklusra követhető a végtermék felsokszorozódása. Az úgynevezett áttörési pont (C^T) értéke adja meg azt a ciklusszámot, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd. Ebből az értékből számoljuk a génről átíródó mRNS mennyiségét a mintában.

A reakciókban SYBR Green festéket használtunk (Powe SYBR Green/ ABI), mely az etidium-bromidhoz hasonlóan interkalálódó molekula és bekötődve a DNS- szálba adott monokróm fényel indukálva 530 nm hullámhosszú fényt bocsát ki (emisszió). Az ebből keletkező mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán szaporodó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik.

| Gén neve | Forward primer szekvencia | Reverse primer szekvencia |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| 16S rRNS | GATAAGCCGAGAGGAAGGTG | GTGTAGCCCAGCCCGTAAG |
| rpsF SMc00568 | TTCTGCATCATCGCGGAC | ATCAAGAAGAACC GCAAGGCT |
| rpsD SMc0485 | AAAACCGTCGGAACGA AACTTG | CGGCCTGCTCGAATCG |
| rpIM SMc01804 | GCCGTCGCCAGATGAAGAACC | GAGGACGGCCGGCTGCTGTGC |
| rpsA SMc00335 | ATCGGCCAGCAGGTCAAGGTT CAG | CGAGCGAGATGCGGTGGGTTTC |
| rpoH1 SMc00646 | GTGAGGAAGAGGTCTGTCTCG | CGAAAGATCCTCCAGCGTTA |
| ibpA SMc04040 | GACCTATCCGCCCTACAAC | GATCGTCAGCGTGTTTTTC |
| pnp SMc11324 | AATCTCTTCGGCGGTATGGG | CGATGCGGTAAAGGCAAAGG |

4. táblázat Az qRT-PCR reakciókban használt primerek és azok szekvenciái.

A kísérletben használt templatok a különböző NCR kezeléseket követően három biológiai párhuzamosból tisztított egyedi RNS mintákat tartalmazták. Első lépésben az RNS mintákból cDNS-t írtunk reverz transzkripcióval (High Capacity cDNA Reverse transcription

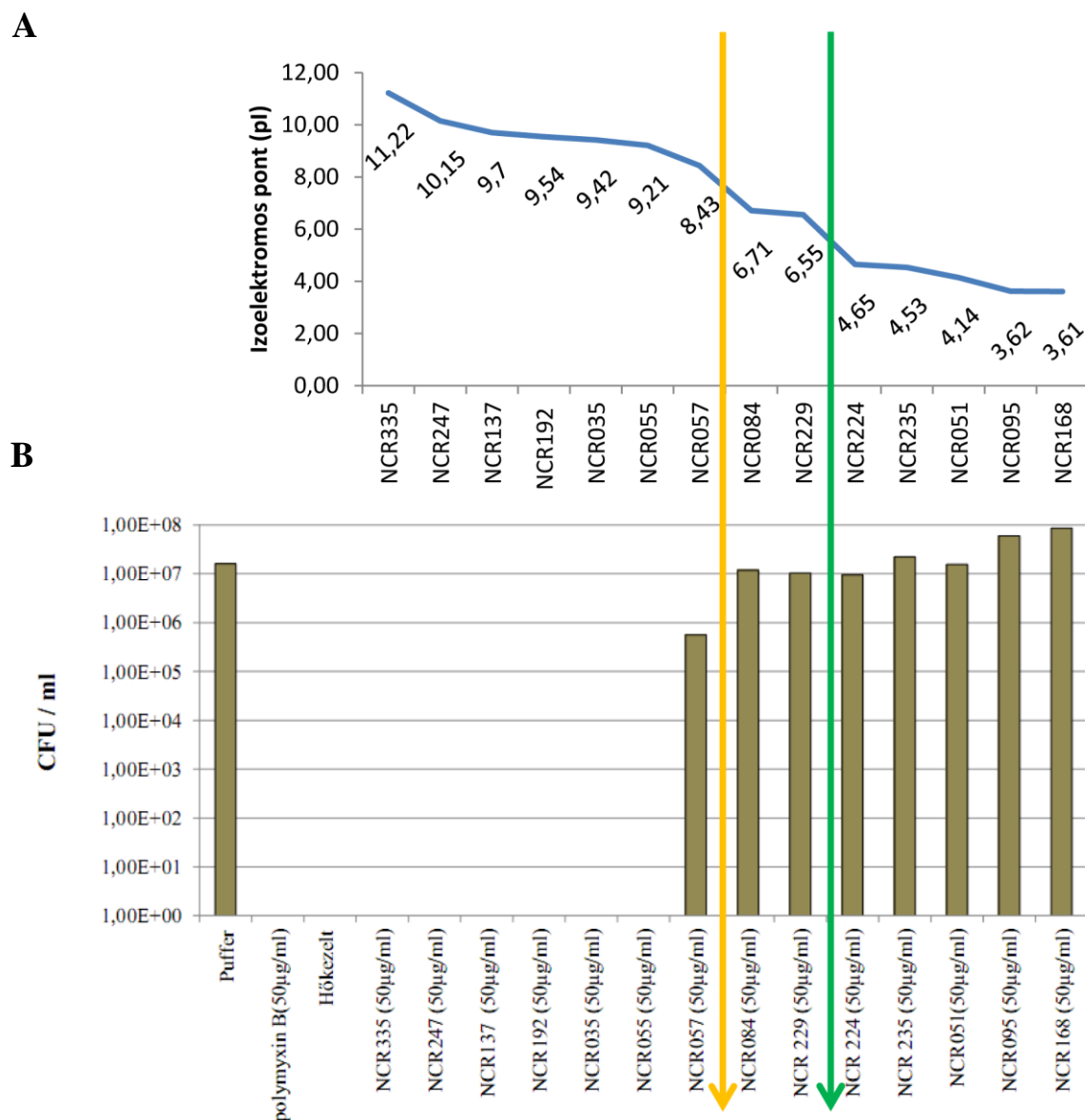
Kit/ABI), majd az egyedi mintákat két-két technikai párhuzamos készítésével mértük. Ezek mérési átlagát (C^T Mean) használtuk az adott génre vonatkozó mennyiségek meghatározáshoz. A szekvenálás ellenőrzésére kiválasztott géneket, a reakciókban használt primerek szekvenciáival a 4. táblázat tartalmazza. Az egyes gének mintánként mért expresszióját a 16S rRNS szintekhez viszonyítottuk, ez volt a számolásoknál használt úgynevezett belső kontroll.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az NCR peptidek *in vitro* hatásvizsgálata *S. meliloti* 1021 baktériumon

Az NCR peptidek szerkezete valamint az őket kódoló gének struktúrája hasonlóságot mutat a magasabbrendű élőlények defenzin-szerű molekuláival. A defenzinek igen variábilis gén családot alkotnak a kationos antimikrobiális peptidek (CAMP) csoportján belül, megtalálhatóak a gerinces és gerinctelen állatokban, a növényekben és a gombákban egyaránt. Hatásaikat tekintve antibakteriális, anti-virális és rovarölő tulajdonságúak lehetnek (Boman, 1995; Douglas, 2011; Mygind és mtsai., 2005). Legtöbb növényi defezin molekulát különböző magokból izoláltak és a patogének elleni védekezésben van kiemelkedő szerepük (Penninckx és mtsai., 1998; B. P. Thomma és mtsai., 2002; B. P. H. J. Thomma és Broekaert, 1998). A defenzinek és a defenzin-szerű molekulák konzervált cisztein mintázattal és szövetspecifikus expresszióval jellemezhetőek, úgymint a bakteroid fejlődésben szabályozó szerepet betöltő, általunk vizsgált NCR peptidek. Az NCR peptidek és a defenzinek további hasonló tulajdonsága, hogy kisméretű molekulák melyeket két exon kódol. Annak kiderítésére, hogy az NCR-nek van-e antirhizobiális hatása, kiválasztottunk 14 különböző izoelektromos ponttal (pI 3,61-11,22) rendelkező NCR molekulát a gén családból, majd a szabadon élő *S. meliloti* 1021 baktérium kultúrát kezeltük 50-50 µg/ml koncentrációban három órán keresztül (15. ábra).

A peptidek egy része, így az NCR335, NCR247, NCR137, NCR192, NCR035 és az NCR055, tehát a csoportból a kationos tulajdonságúak, elpusztították a szabadon élő baktériumot, így az inkubálást követően azokból nem tudtunk telepeket nevelni. Az NCR057 peptid gyenge befolyással volt a sejtek életképességére és a kontrollhoz viszonyított alacsonyabb telepszámot detektáltunk. Az NCR084, NCR229, NCR224, NCR235, NCR051, NCR095 és az NCR168 kezelések nem csökkentették a baktérium kultúra telepszámát. Összegezve a CFU teszt eredményeit, levonhattuk azt a következtetést, hogy az általunk vizsgált növényi peptidek közül a kationos tulajdonságúak (pI 8,43-11,22) sejtölő hatást váltottak ki a szabadon élő szimbiotikus partneren (*ex planta*).

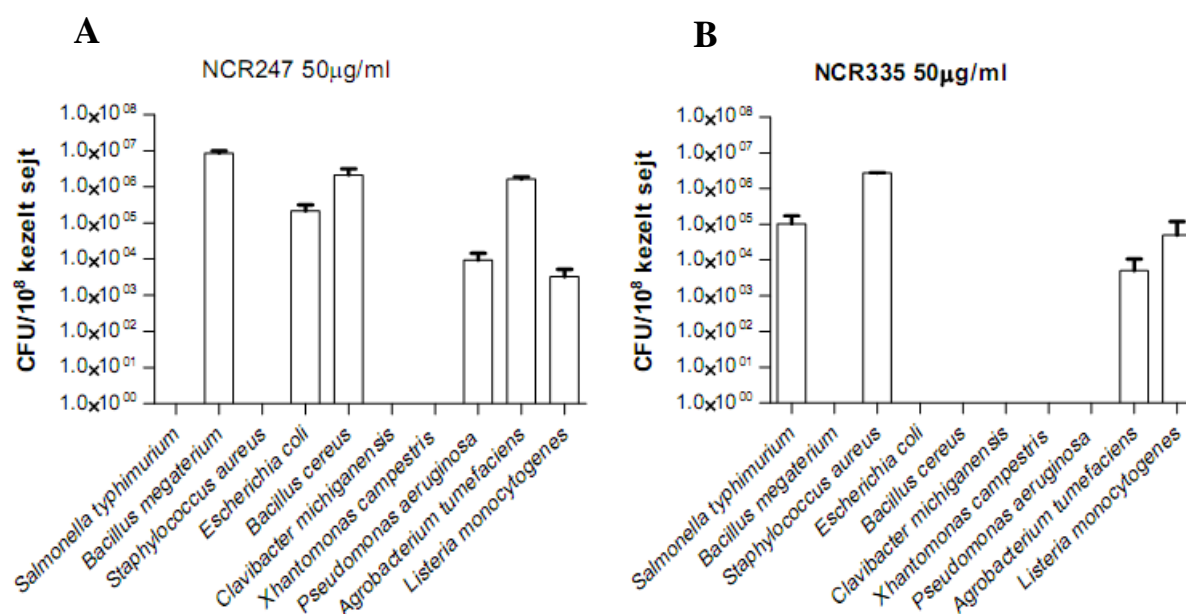


15.ábra Az NCR peptidek hatása szabadon élő *S. meliloti* baktériumra. (A) A kísérlet során tesztelt különböző NCR molekulák izoelektromos pont alapján történő ábrázolása. (B) A különböző NCR molekulák hatása CFU tesztben. Pozitív kontrollnak pufferrel, negatív kontrollnak hővel előlt és polymyxin-B-vel (50 µg/ml) kezelt sejteket alkalmaztunk. Kationos tulajdonságúak: NCR335, NCR247, NCR137, NCR192, NCR035, NCR055 és NCR57 neutrális: NCR084 és NCR229, bázikus NCR-ek: NCR224, NCR235, NCR051, NCR095, NCR168. y tengely: NCR peptidek csökkenő pI sorrendben; x tengely: $10 \cdot 10^8$ db sejtszám (A grafikon egy reprezentatív kísérletsor eredményeit ábrázolja).

4.2. Az NCR peptidek antimikrobiális spektruma

Annak tanulmányozására, hogy az *S. meliloti*n kívül más Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokra van-e antimikrobiális (defenzin szerű) hatása az NCR molekuláknak,

kiválasztottunk két kationos tulajdonságú peptidet a további vizsgálatokhoz. Az NCR247 jelenleg a legjobban jellemzett NCR peptidek egyike, az NCR335 pedig a legkationosabb ismert peptid a hatalmas géncsaládban. Ezek hatását teszteltük *in vitro* különböző Gram-negatív (*E. coli*, *S. typhimurium*, *A. tumefaciens*, *P. aeruginosa*, *X. campestris*) és Gram-pozitív (*B. megaterium*, *B. cereus*, *C. michiganensis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) humán, állati és növényi patogéneken. CFU tesztben vizsgáltuk ezen baktériumok telepformáló képességét három órás, 50 µg/ml-es peptidkezeléseket követően.



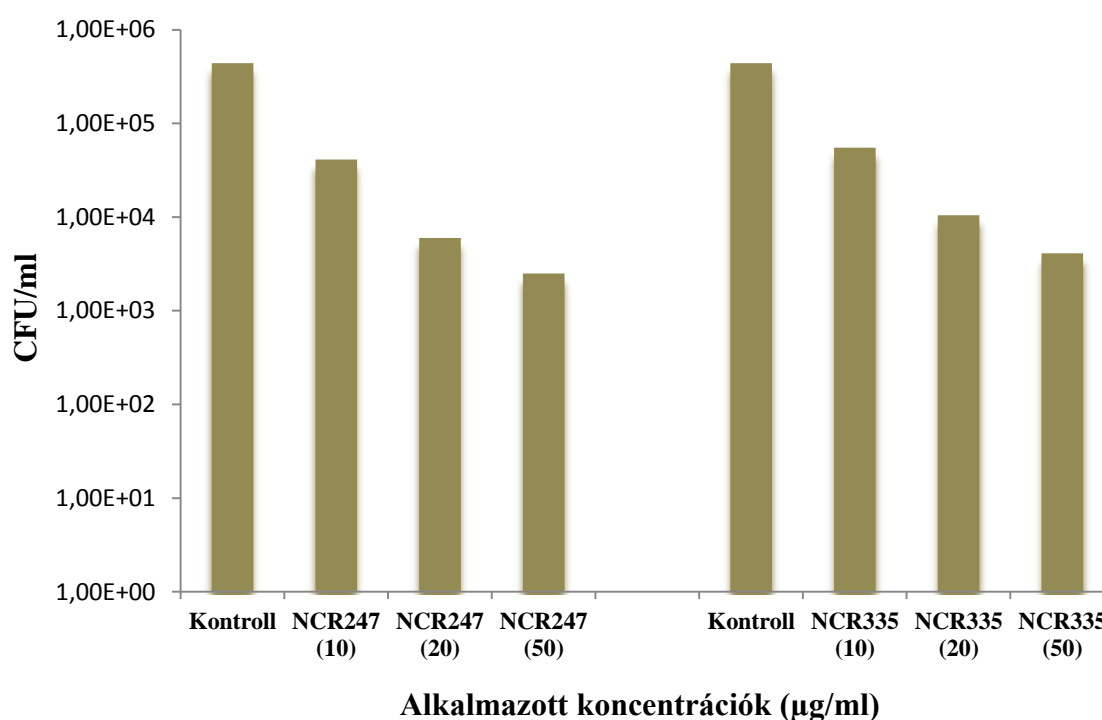
16. ábra Az NCR peptidek hatása különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokon (CFU teszt). Az (A) NCR247 és (B) NCR335 (50µg/ml) peptidek hatása patogén és nem patogén baktériumokon három órás kezelést követően. A peptidek sejtölő hatását a baktériumok telepformáló képességének csökkenésével mértük. A grafikonon ábrázolt eredmények három biológiai mérés átlagát szemléltetik, melyek 10⁸ darab kezeletlen baktériumsejtre vonatkoznak.

Mindkét peptid különböző mértékben, de legalább egy nagyságrenddel csökkentette az élő sejtek számát az összes tesztelt baktérium esetében. A vizsgált baktériumok többsége valamelyik kezelés hatására pedig teljesen elpusztult. A *Xanthomonas campestris* és a *Clavibacter michiganensis*, melyek növényi patogének, egyik kezelést követően sem voltak képesek telepformálásra, ezek tehát különösen érzékenyek bizonyultak. Az *Agrobacterium tumefaciens* és a *Listeria monocytogenes* a 0,01-5% túlélő sejttel mérsékelten ellenállóknak tekinthetők a vizsgált mikroorganizmusok között (16. ábra).

A tanulmányozott növényi peptidek tehát egyértelmű sejtölő, antimikrobiális/antirhizobiális hatással rendelkeztek különböző humán/állati és növény patogéneken és nem patogén baktériumokon *in vitro*.

4.3. Az NCR peptidek dózis-hatás vizsgálata *S. meliloti 1021* baktériumon

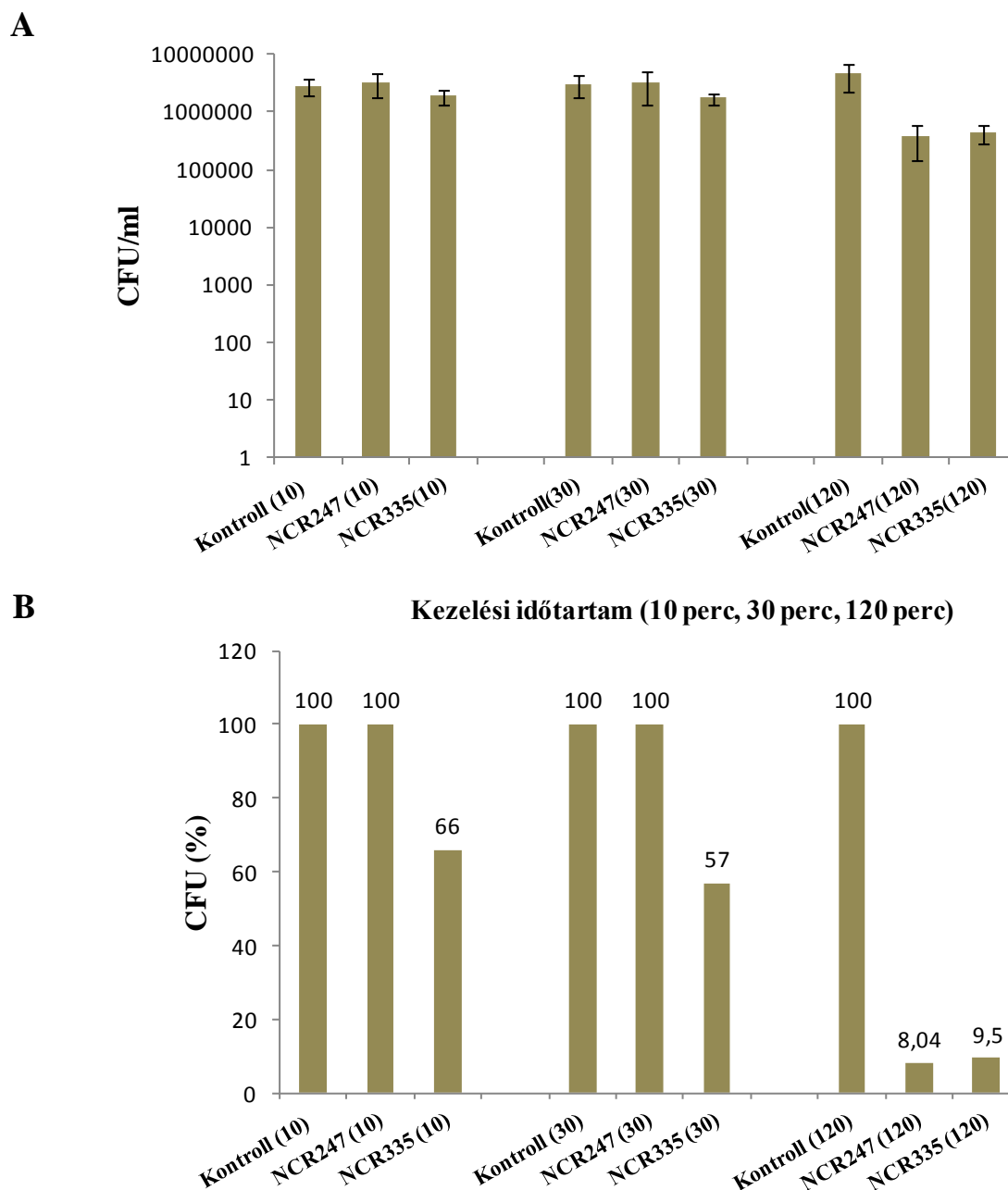
Az NCR-ek hatásmechanizmusának és esetleges célpontjainak felderítésére transzkriptom analízist terveztünk *S. meliloti* baktériumon. Ez a megközelítés betekintést enged a baktérium génműködéseiben bekövetkező változások felderítésébe a peptidkezelések hatására. A kísérleti körülmények pontos meghatározásához teszteltük az egyes peptidek hatásának dózis- és időfüggését.



17. ábra Az NCR peptidek *ex planta* baktericid hatása. A *S. meliloti 1021* törzset inkubáltunk NCR247 és NCR335 peptidekkel 10µg/ml, 20µg/ml és 50µg/ml koncentrációkban, két órán keresztül. A grafikon a CFU teszt eredményeit ábrázolja logaritmus skálán. 50µg/ml peptid koncentrációknál az *S. meliloti* sejtek 99%-a elpusztult. 20µg/ml-nél 1-2%, 10µg/ml-nél 9-12% a túlélő sejtek száma. A grafikon egy reprezentatív kísérletsor eredményét szemlélteti.

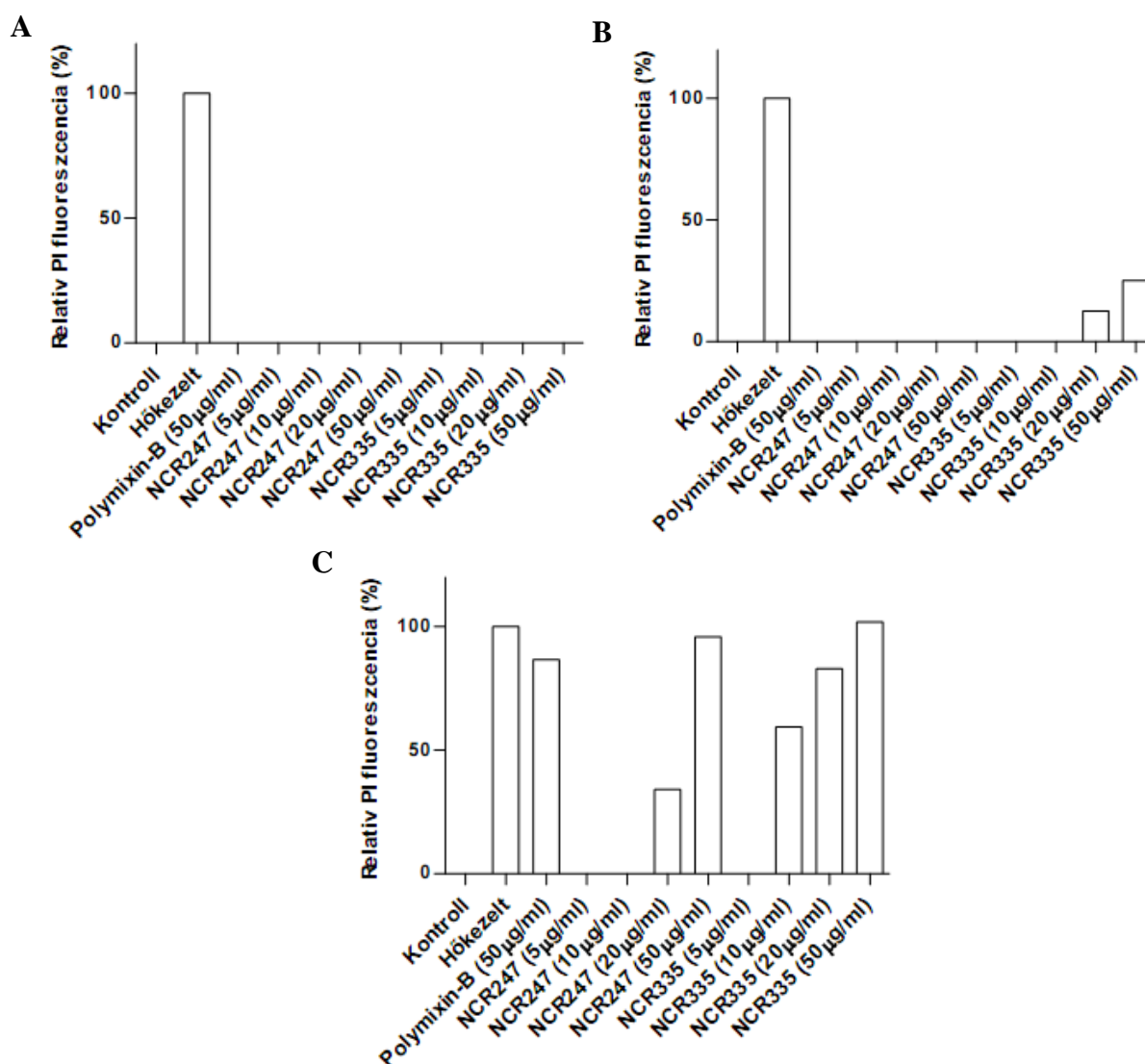
Az *S. meliloti* baktérium NCR-ekkel szemben mutatott érzékenységének meghatározásához a szabadonélő sejteket 10µg/ml, 20µg/ml és 50µg/ml koncentrációkkal

kezeltük 30°C-on, két órán keresztül, erőteljes rázatás mellett, majd szilárd TA táptalajra szélesztettük. A petricsészékben felnőtt baktérium telepeket számolva megállapítottuk az 1 ml-re vonatkozó CFU egységet. A két órás peptid kezelés hatására a túlélő *S. meliloti* telepek száma a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva 10µg/ml-nél 9-12%, 20µg/ml-nél 1-2 %, míg 50µg/ml esetén 1% alatt maradt mindkét peptid esetében (17. ábra).



18. ábra Az NCR247 és NCR335 peptid hatásának időfüggése *S. meliloti* 1021 törzs esetén. A 10 perces, 30 perces és 120 perces, NCR247 és NCR335 10µg/ml koncentrációjú kezeléseket követően mért **A**, CFU értékek **B**, CFU értékek kontrollhoz viszonyított %-ban megadva. Az (A) grafikon a három biológiai párhuzamosnál mért értékeket ábrázolja a szórás feltüntetésével. A (B) grafikon a három biológiai mintán mért adatok átlagértékéből számolt százalékok.

Az eredményeinkben legkisebb változást kiváltó 10 μ g/ml koncentrációnál megvizsgáltuk a két peptid antirhizobiális hatásának időfüggését. CFU tesztben mértük a 10 perces, 30 perces és 120 perces kezeléseket túlélő sejtek számát. Az NCR247 peptid 10- és 30 perces kezeléseinél nem tapasztaltunk CFU tesztben változást, míg az NCR335 már 10 és 30 percet követően is antirhizobiális hatásának bizonyult *in vitro* (57-66% telepszámmal a kontrollhoz képest). A 120 perces kezelések a korábbi kísérlettel egybehangzó drasztikus telepszám csökkenést okozták mindkét alkalmazás esetén (18. ábra).



19. ábra A membrán-permeabilitás változásának detektálása PI fluoreszcenciával. Az *S. meliloti* 1021 baktérium PI felvétele az NCR247, illetve NCR335 peptidekkel kezelt mintákban, 10 perces (A); 30 perces (B) és 120 perces (C) kezelést követően. Az A, B, C grafikonok egy kísérletsor eredményeit szemléltetik.

Az antimikrobiális hatású peptidek gyakran a negatív töltésű bakteriális membránhoz kötődve, megváltoztatják annak szerkezetét és áteresztőképességét, így az nagyobb molekulák számára átjárhatóvá válik. Ezért megvizsgáltuk PI tesztben különböző NCR koncentrációknál (5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) és időtartamoknál (10 perc, 30 perc és 120 perc) a membrán permeabilitásának változását. A PI fluoreszcens tesztben, a kezelési idővel párhuzamosan az emelkedő PI felvétel jelezte a sejtek megváltozott membránszerkezetét, és bizonyos számban az adott sejtek pusztulását is. A 10 perces kezelésekből egyik peptidnél sem volt mérhető PI felvétel (19.A. ábra).

Ahogy a CFU teszt is rámutatott, a két növényi peptid közül a drasztikusabb hatást az NCR335 váltotta ki. A 30 perces kezelésnél a 20µg/ml, illetve 50µg/ml-es peptidkoncentrációnál az emelkedő PI felvétel jelezte a membránban bekövetkező szerkezetbeli változást. 120 percet követően mindkét peptidnél mérhető a PI felvétel, amely összhangban van a csökkenő telepszámot mutató CFU eredményekkel. A 20µg/ml és 50µg/ml peptidkoncentráció az NCR247 esetén a 120 perces mintában, az NCR335 peptid pedig már a 30 perces mintában is kiváltotta a PI intracelluláris megjelenését (19.B,C ábra).

4.4. Az *S. meliloti* 1021 transzkriptom általános elemzése

Azért, hogy megtudhassuk az *S. meliloti* 1021 baktériumok korai génexpressziós válaszát a peptidhatásra a 10 µg/ml dózist választottuk és 10- és 30 perces kezeléseket alkalmaztunk. A 10 percig és 30 percig tartó kezeléseket alkalmasak arra, hogy megfigyelhessük a baktériumok korai válaszát a peptidhatásra, a sejtek jelentős pusztulása nélkül.

Az egyedi vonalkódokkal ellátott mintákban különböző számú megszekvenált fragment volt detektálható (Total gene read). Az összes leolvasott egység 98,2-98,5%-a egyedi génekhez köthető (Unique gene reads). Az egyes mintákhoz tartozó összes és egyedi fragmentszámokat összegzi az 5. táblázat.

Az indukált és represszált gének azonosításához az RPKM (Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads) értékeket hasonlítottuk össze. Ehhez az 1 kb-nyi génhosszra normalizált gének leolvasott fragmentszámát 1 millió-ra vonatkoztattuk. A

normalizálást követően kapott adatokból csak a kétszeres, vagy az azt meghaladó expressziós különbséget elért géneket használtuk a további analízisben.

| Minta | | Összes szekvenált fragment (Total gene read) | Egyedi fragmentek (Unique gene reads) |
|------------|-----|---|--|
| K 10' | CDS | 7363588 | 7231194 |
| K 30' | CDS | 6295788 | 6184176 |
| NCR247 10' | CDS | 8602654 | 8479798 |
| NCR247 30' | CDS | 3700607 | 3648346 |
| NCR335 10' | CDS | 4843112 | 4767863 |
| NCR335 30' | CDS | 3446577 | 3396790 |

5. táblázat A szekvenálás során leolvasott fragmentszámok eloszlása az egyes minták között. Az egyes minták összes szekvenált fragment száma és a genom egyetlen pontjába térképeződő leolvasási szakaszok száma. 10': 10 percig tartó kezelés; 30': 30 percig tartó kezelés.

Az *S. meliloti* gének 14%-a, azaz összesen 909 gén estén detektáltunk legalább kétszeres expressziós különbséget a kontroll (kezeletlen) mintában mért értékekhez viszonyítva. Ebből 365 gén expressziós szintje csökkent és 543 ORF-é nőtt a kétszeres határértéket meghaladó mértékben.

| Peptid neve | Kezelés időtartama (perc) | Változás iránya (minimum kétszeres) | Összes változó gén száma | Prediktált, változó gének száma (KEGG) |
|-------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--|
| NCR247 | 10 | túlműködés | 166 | 50 |
| NCR335 | 10 | túlműködés | 360 | 107 |
| NCR247 | 10 | alulműködés | 126 | 72 |
| NCR335 | 10 | alulműködés | 286 | 186 |
| NCR247 | 30 | túlműködés | 178 | 29 |
| NCR335 | 30 | túlműködés | 335 | 94 |
| NCR247 | 30 | alulműködés | 105 | 72 |
| NCR335 | 30 | alulműködés | 216 | 152 |

6. táblázat A kísérletek során a kétszeres határértéket meghaladó változást mutató gének eloszlása az egyes mintákban. Az NCR247 és NCR335 kezeléseket által változó gének száma, a prediktált gének számának feltüntetésével. KEGG analízisben megvizsgálva az összes változó gént, jóval kevesebb azok száma, amelyekhez társítható valamilyen funkció.

A kapott adatok interpretációját nehezítette, hogy a *S. meliloti 1021* adatbázisban nagy számban található olyan gének, amelyek egyelőre csak feltételezett hipotetikus gén besorolást kaptak. Ez a magyarázata annak, hogy a határértéket jelentő expressziós különbséget elért nagyszámú gén csak kis részéhez társítható funkció a KEGG analízis alapján (6. táblázat).

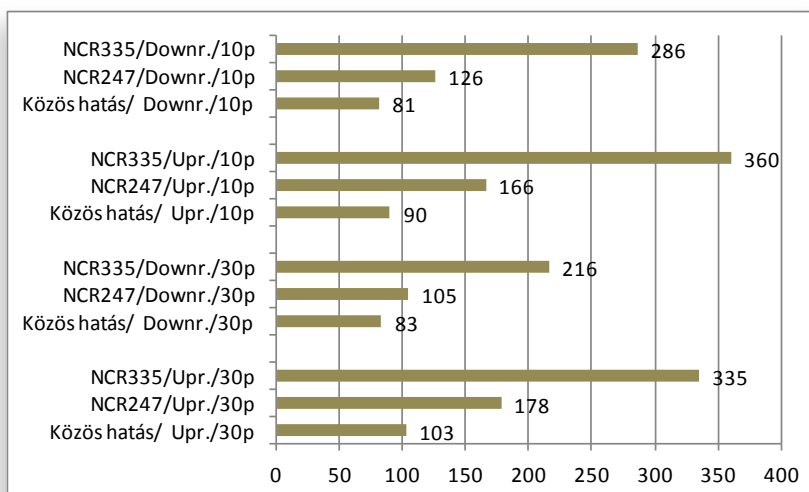
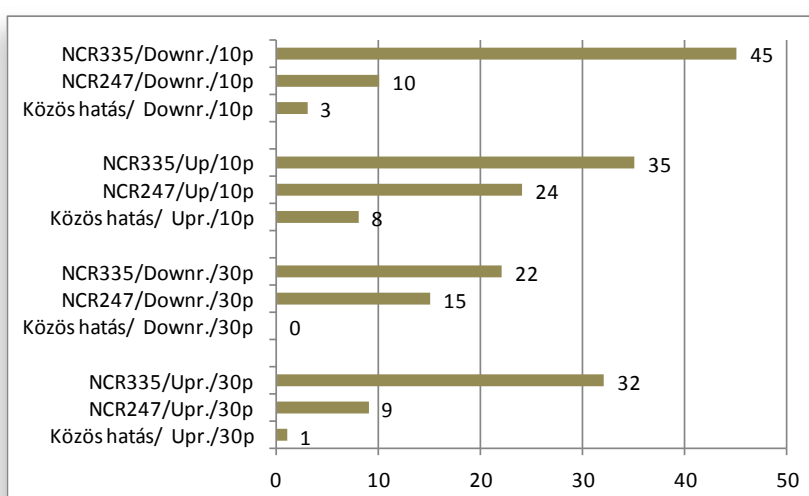
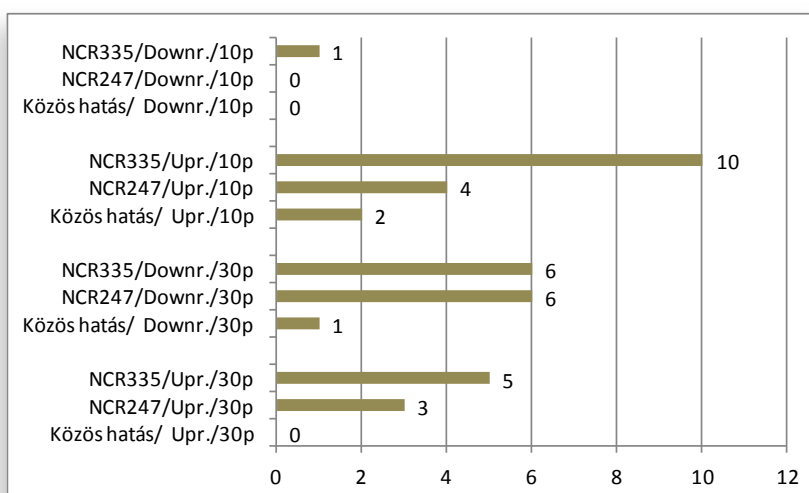
A különböző NCR peptidekkel kezelt mintákban nagy számban találunk olyan géneket, amelyek expressziós aktivitása mindkét peptid hatására megváltozott. A 10 perces kezelésekben csökkent expressziót mutató gének közül 81 darab mindkét mintában megjelent mint kétszeres expressziós különbséget meghaladó gén. A 30 perces kezelésekben 83 darab gén represszáldott mindkét peptid hatására minimum kétszeres mértékben. A kétszeres génexpressziós növekedést elért gének között a 10 perces kezelt mintákban 90, a 30 perces mintákban 103 darab gén található, amelyek mind az NCR247 mind az NCR335 hatására azonos irányban változtak (20. ábra).

A minták elemzése során nem találtunk egyetlen gént sem, mely a két peptid hatására ellentétes irányú expressziós változást mutatna.

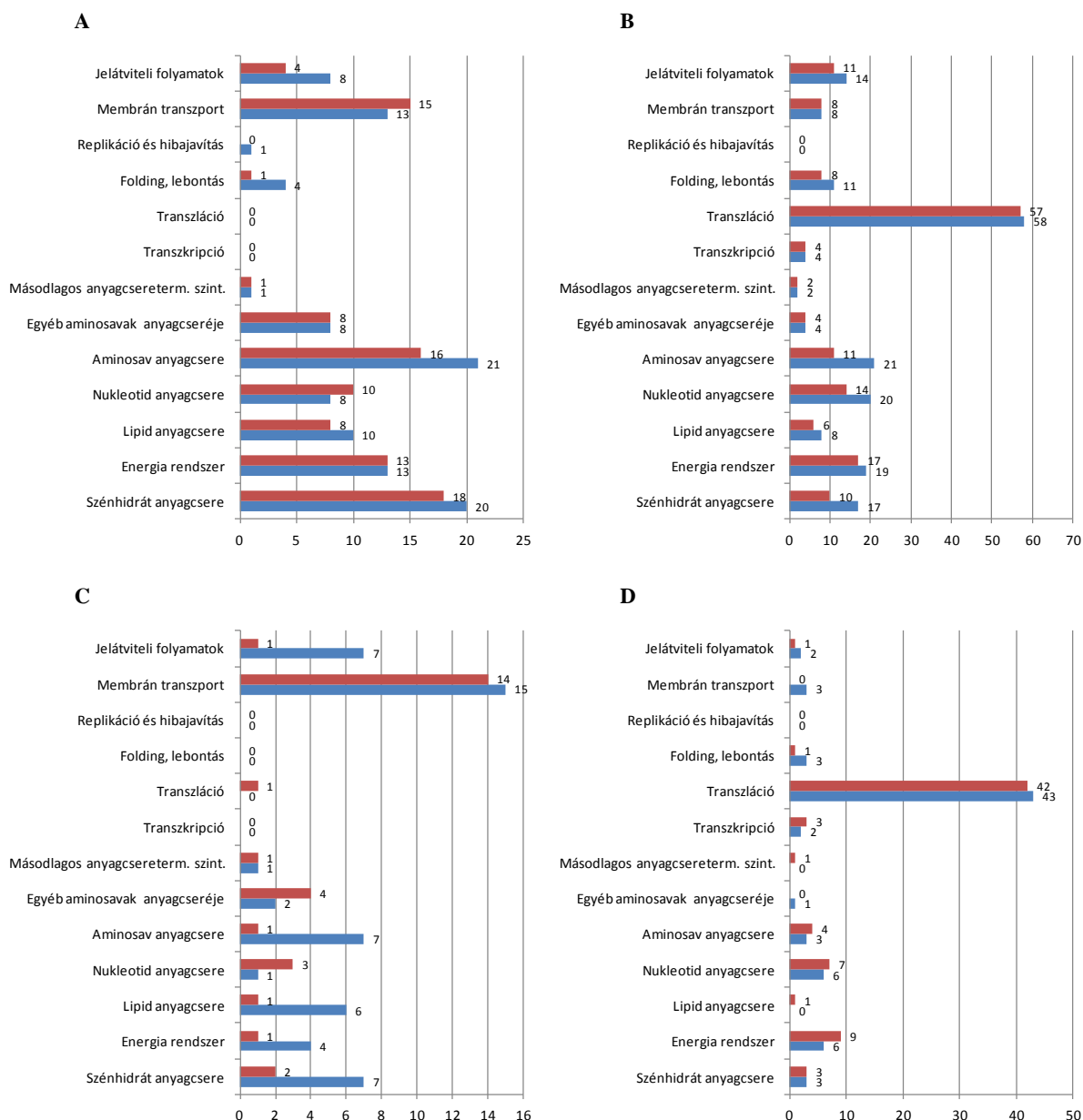
Mintánként elemeztük az mRNS szinten minimum kétszeres különbséggel változó gének lehetséges funkcióját KEGG analízisben. Nagyobb, funkcionálisan összetartozó csoportokba soroltuk az egyes kezeléseknél talált prediktált géneket, melyeket a 21. ábrán foglaltunk össze.

Láthatjuk, hogy az NCR335 peptiddel történt kezelések jóval nagyobb számú gén működésében okoztak változást, mint az NCR247. A magasabb expressziót mutató gének csoportjai közül a nagyobb számú érintettség miatt kiemelhetjük a membrán transzport folyamatokat, míg főképp az NCR335-tel kezelt mintákban az aminosav-, a nukleotid-, a lipid- és a szénhidrát anyagcseréhez tartozó géneket valamint az energia szolgáltatást végző rendszer elemeit is.

A kezelések hatására csökkent mRNS szinttel reagáló gének legnagyobb csoportja a transzlációs rendszerhez kapcsolódik, jóval kisebb mértékben a nukleotid anyagcseréhez és az energia szolgáltatáshoz, bár az NCR335 peptidkezelések nagy számban okoztak génexpresszió csökkenést további a lipid-, energia-, szénhidrát-, aminosav anyagcserében a lebontó és jelátviteli folyamatokban egyaránt. Láthatjuk, hogy mindkét peptid, de főleg az NCR335 hatásai komplex változást okoznak az *S. meliloti 1021* kifejeződő genomjában, melyek együttes hatása az *in vitro* kezelésekben a hosszabb kitettség (2 és 3 óra), illetve a magasabb peptid koncentrációk esetén a sejthalál.

A**B****C**

20. ábra Az NCR247 és NCR335 peptid kezelésekre (A) legalább kétszeres, (B) legalább ötszörös, (C) legalább tízszeres működésbeli különbséget mutató gének számának változása *S. meliloti* 1021-ben, a mindkét peptidnél változó gének számának feltüntetésével. Upr.: túlműködő gének; Downr.: represszált gének.



21.ábra A kétszeres határérték felett vagy alatt változó gének funkcionális analízise (KEGG). A kék oszlopok a 10 perces kezeléseknél, a piros oszlopok a 30 perces kezeléseknél változó gének számát szemlélteti. Az (A) grafikon az NCR335 peptid hatására magasabb expressziót mutató gének eloszlását, a (B) az NCR335 peptid kezelésre alulműködő gének eloszlását, a (C) az NCR247 peptidre túlműködő és a (D) az NCR247 peptid kezelésre alulműködő gének számszerű, funkcionális eloszlását mutatja.

4.5. Az NCR peptidek által okozott általános génexpresszió csökkenés

Az NCR247 és NCR335 peptidek által előidézett génműködésbeli változások sok esetben egymással átfedtek a különböző mintákban (20. ábra). Ezeket a közös halmazokat

tekintélyes számú gén alkotta, bár esetenként jelentős aktivitásbeli különbséggel az egyes mintákban. A gén expresszió csökkenéssel járó események legnagyobb csoportja a peptid kezeléseket követően a genetikai információs folyamatok része. A transzkripciót érintő gének közé tartoznak az RNS-polimeráz alegységeket például az RpoABCZ, a transzkripció terminátor Rho-t és az antiterminációs NusG fehérjét kódoló gének. A translációs folyamatokat érintő faktorok, mint például a translációs iniciációs faktorok (IF1-*infA*, IF2-*infB*, IF3-*infC*), az elongációs faktorok (*fusA1*, *tuf*, *tsf*), a riboszómához kapcsolódó Tig nevű saperon fehérje, valamennyi riboszómális alegységet és proteint kódoló (Rps, Rpm, Rpl) és a riboszóma biogenezisben szerepet kapó fehérjék (HflX, EngD) mindkét peptidre vonatkozóan a csoport részét képezik. Az RNS érésben és a fehérje konformáció változásban szerepet játszó ATP-függő RNS helikázok az *rhIE1*, *rhIE2*, a ribonukleáz-E, és a poliadeniláz *pnp* is csökkent expresszióval reagáltak mindkét peptid kezelésre. A purin, tiamin bioszintézis kezdeti lépéseinél aktiválódó enzimek, valamint a nukleotid-difoszfát kináz (Ndk) mely a foszfát-csoportok cseréjét katalizálja különböző nukleozid-difoszfátok között, ugyancsak alulműködött. További jelentős biokémiai funkciók érintettek, úgymint az oxidatív foszforiláció és a zsírsav bioszintézis néhány de igen fontos eleme, például az F₀F₁ ATP szintetáz alegységek (*atpF*, *E*, *B*, *A*, *H*, *G*, *D*, *C*), a citokróm bc₁ komplex (*fbCFBC*) és a zsírsav bioszintézis néhány enzimét kódoló gén is. Számos ABC transzporter működését befolyásoló gén expressziós szintje csökkent, jelen felsorolásban a mindkét peptidet érintő kadmium (Cd) exportot (*Smc04128*, *Smc04167*) és a spermidin/putrescin transzport rendszert érintő géneket (*Smc01652*, *Smc01179*) emlitem.

4.6. Az NCR peptidek által okozott általános génexpresszió növekedés

Az NCR247 és NCR335 peptidek által okozott génexpressziós növekedés számos esetben kapcsolható valamilyen stressz folyamathoz. Itt említhető például a stressz fehérjék közül az IbpA, RpoH1 és az MsrA. Az RpoH1 egy fontos szigma faktor, mely további több tucat gén működését befolyásolja. A Hsp20 proteinek, a GroES, GroEL, DnaJ Smc01106 további indukálódó hősokk-proteinek. A *degP3*, *msrA3*, a *clpB* és a *hslV* ATP-függő proteázokat kódoló gének szintén túlműködéssel reagáltak a kezelésekre. A kezeléseket követő eredménye 15 transzkripció regulátort (például *Smc02888*, *actR*, *feuQ*, *fecI*) kódoló gén megnőtt mRNS szintje, melyek felelősek lehetnek további 35 különféle membrán-transzporter

egységet kódoló gén (*ndvA*, *Smc04350*, *Smc04351*, *dctA*) magasabb expressziójáért. A legtöbb esetben nem ismert a membrán transzporterek által szállított szubsztrát molekula, de az bizonyos, hogy például a ZnuABC nagy hatékonysággal közvetíti a cink (Zn) felvételt a Zur transzkripció faktor szabályozása alatt. Így a FoxA-FhuP-HmuSTUV-ről is tudjuk, hogy a vas transzportban játszik kiemelkedő szerepet. Néhány redox fehérje (glutation transzferáz, szén-monoxid dehidrogenáz alogyséket, tioredoxin és glutaredoxin) és zsírsav oxidáció pár enzime is indukálódott.

4.7. Peptid specifikus génexpresszió növekedés

A transzkriptóma tárgyalásánál fontos külön is elemeznünk azokat a géneket, amelyek működésbeli változása az egyik NCR peptidhez köthető. Ezek a specifikus hatások. Nagyszámú gént találtunk azonban az analízis során, amelyek változása mindkét peptidnél azonos irányba mutatott, de a vizsgált körülménynél a kontrollhoz képest nem minden mintában érte el a minimális kétszeres különbséget. Ezek technikailag nem tekinthetők szignifikánsnak, mégis említésre érdemesek lehetnek.

4.7.1. Az NCR335 peptid specifikus génaktiváló hatása

A 10 perces NCR335 kezelést követően specifikusan túlműködő géneket a 3. függelékben mutatjuk. A viszonylag kisszámú gén, amelyeknek funkcionális szerepet találhatunk, például a metán anyagcserével hozhatók kapcsolatba (*SMb20131*, *SMb21691*, *SMA0005*), kataláz enzimet kódol (*katA*), vagy a propanoát anyagcsere része (*SMb20752*, *SMb20756*). Az *SMc01820*, *SMc01821* a β -alanin anyagcserében, a *sucACD* operon génjei a citromsavciklusban szerepet játszó fontos elemek.

A 30 perces kezelést követően kizárólag az NCR335 peptidnél upregulált géneket a 4. függelékben mutatjuk be. Többségük hipotetikus funkcióval rendelkezik, mindössze a *ppe* (*SMb20195*), *SMc02776* és a *xyIB* (*SMc03164*) géneket tudjuk a pentóz- és glükuronát átalakuláshoz kötni.

Az NCR335 peptid hatására mindkét kezelési időtartamnál a kontrollhoz viszonyított magasabb expressziót mutató gének összességét a 2. függelék tartalmazza. A számos

upregulálódó gén között főleg a lipid anyagcsere folyamatokhoz tartozóakat találunk KEGG analízisben, mint például a *pccB* (*SMb20755*), *SMa0151*, *cfa2* (*SMc02645*), *SMc02636*, *tesA* (*SMc03836*) gének. A legnagyobb csoportot a transzkripciót szabályozó gének (*SMb20215*, *SMb21115*, *SMb21706*, *SMa0402*, *SMa0961*, *SMa1056*, *SMa5007*, *SMc00129*, *SMc00329*, *SMc00458*, *SMc00653*, *SMc02584*, *SMc02876*, *SMc02888*, *SMc03169*) és a membrán transzport elemek (*SMc03807*, *SMb20506*, *SMb20117*, *SMb206333*, *SMb20345*, *SMb20346*, *SMc00563*, *SMc00564*, *SMc03825*) alkotják.

4.7.2. Az NCR247 peptid specifikus génaktiváló hatása

Az NCR247 növényi peptidre 10 perces kezelésben túlműködő gének sorát szemlélteti a 9. függelék. A csoport néhány tagja része a kétkomponensű rendszernek, mint például a *kdpABC*, *SMc01594*, *rhbB*. Ezek az ion transzportban játszanak szerepet. Egyéb transzport folyamatokhoz tartozó gének az *SMb20056*, *smoE*, *modA*, *bacA*, *pgsA*, *SMc00817*, *SMc00977* és az *SMc04396*.

A 30 perces NCR247 kezelésben kizárólag a peptidhez specifikusan köthető megemelkedett expressziót mutató gének összességét a 10. függelékben foglaltuk össze. Ezek között is találunk géneket különböző transzport folyamatokból, például az *emrE*, *exbBD*, *rhrA*, *SMc02589*, *SMc02156*, *SMc00784*, *SMb21432*, *SMc03119* valamint a protein lokalizációban és protein transzportban szereplő *exbB*, *exbD* és az *SMc01515* géneket.

A kezelési időtartamtól függetlenül (mind a 10 perces mind a 30 perces mintákban) az NCR247 peptidkezeléseknél túlműködő gének a 8. függelékben találhatóak. A csoport tagjai kapcsolhatók membrán-transzport folyamatokhoz, szerepet játszanak különféle bioszintetikus és lebontó folyamatokban. Találunk köztük ABC transzporter alegységeket, például *fbpC1* (Fe^{3+} ion felvétel), *SMb20156*, *SMb21431*, benzoát degradációs elemet (*SMc04314*), tRNS bioszintézis (*thrS*), aminosav anyagcsere (*SMc01656*) és a purin anyagcsere (*cyaK*) géneket. A YedYZ szulfid oxidáz alegységek, az ExbBD proteinek kódoló gének, melyek a TonB-vel alkotott komplexben a vas felvétel fontos elemei, kizárólag az NCR247 peptid hatására mutattak markáns expressziós növekedést mindkét kezelési időpontban.

4.8. Peptid specifikus génexpresszió csökkenés

4.8.1. Az NCR335 peptid specifikus represszálo hatása

48%-kal több volt azoknak a géneknek a száma, melyeknek a peptidkezelések eredményeként csökkent az expressziója. A 10 perces NCR335 kezelést követően specifikusan alulműködő géneket a 6. függelékben foglaltuk össze. Az ide tartozó gének szerepet kapnak az aminosav anyagcserében (*aroQ*, *pyrBG*, *serB*, *SMb20821*, *dapA*, *lysA*, *thrA*), az organikus savak anyagcseréjében (*fumC*, *glmS*), és a xenobiotikum anyagcsereútvonalában is (*adhA1*).

A 30 perces NCR335 peptid kezelés után a jelentős számban megjelenő down-regulált gének között viszonylag kevés volt a specifikusan, csak ehhez a peptidhez köthetőek száma. Ezeket foglaltuk össze a 7. függelékben. Kiemelhetjük közülük az *lpsB*, *ppiB*, *SMc00146* és az *ureE* a makromolekulák anyagcseréjéhez vagy az *ilvI*, *SMA1952*, *SMc00146* nitrogén anyagcseréhez kapcsolható géneket.

Specifikusan az NCR335 peptid hatására down-regulálódó gének között találtunk olyanokat, melyek mind a 10 perces, mind a 30 perces kezeléseknél előfordultak. Ezeket a géneket az 5. függelékben gyűjtöttük össze. A csoport tagjai között kiemelkedő számban jelentek meg a riboszomális proteinek kódoló gének, mint például az *rpsM*, *rpsP*, *rplU*, *rpmB*, *rpmE*, *rpmF*, *rpmG*, *rpmH* vagy az *rpmJ*. Habár a csoportosítás szerint ezek csak az NCR335 peptid hatására változtak kétszeres határértéket meghaladó mértékben, a specifikusság tekintetében érdemes ezt megfontoltan figyelembe venni, hiszen tudjuk, hogy igen nagy azoknak a riboszomális proteinek kódoló géneknek a száma, amelyeket mindkét kezelésben csökkent expressziót mutattak. Az RNS degradációban jelentős *rhle2*, *rne*, *rho* és az oxidatív foszforiláció néhány elemét kódoló gén, mint az *atpF*, *atpH*, *fbcb*, *fbcf*, *ppa*, *nuoK1*, a *mucR* transzkripció faktor és néhány RNS-saperon-fehérje (hideg-sokk fehérje) (*Csp1*, *Csp4*, *CspA2*, *CspA8*) és az RNázP szintén ebbe a csoportba sorolhatóak.

4.8.2. Az NCR247 peptid specifikus represszálo hatása

Alig több mint 20 gén sorolható az NCR247-el 10 perces peptid kezelést követően alulműködő gének csoportjába. A rövid, de teljes lista a 12. függelék tartalma. Itt találjuk a

nitrogén anyagcsere (*norE*), a glutamát anyagcsere (*gabD5*), a leucin és izoleucin szintézis (*ileS*), a membrán komponens bioszintézis (*lpxC*) és a protein szekréció (*ffh*) egy-egy elemét.

A 30 perces kezelésben az NCR247 peptidre specifikusan downregulálódó gének szintén kis csoportot képviselnek a változó gének nagy halmazában. Ezek a 13. függelékben találhatóak. Közülük csupán a *hisH* (hisztidin anyagcsere), *fdh* (zsírsav anyagcsere) és a *coxP* (oxidatív foszforiláció) génekről tudjuk, hogy mely útvonalakban játszanak szerepet.

Kizárólag az NCR247 gümő specifikus peptid hatására, mindkét kezelési időpontban csökkent expressziós aktivitást csak kis csoport képvisel a határértéket meghaladó változást elért gének között. Ezeket a géneket listáztuk a 11. függelékben. A csoport tagjaihoz, az adatok jelenlegi feldolgozottsága mellett, nem találtunk semmilyen köthető funkciót.

4.9. A változások áttekintése funkcionális kategóriák szerint

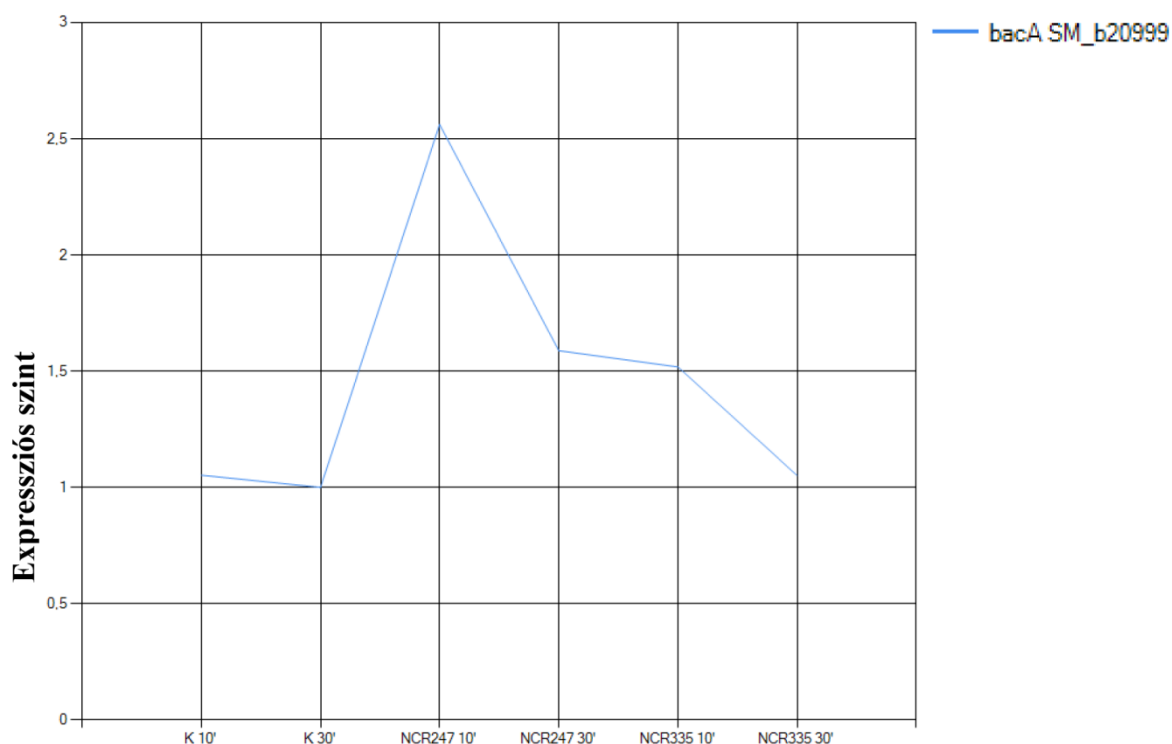
4.9.1. Membránalkotó elemek és membránkapcsolt folyamatok változása

A baktérium sejteket határoló membrán egy többrétegű, bonyolult struktúra, amely elsődleges támadási felülete a környezetből jövő hatásoknak. A *Rhizobiumok* sejt felszíni struktúráját alkotó poliszaharidok az exopoliszaharidok (EPS), a kapszuláris poliszaharidok (CPS) és a lipopoliszaharidok (LPS), amelyek a védelmi funkció mellett a szimbiózis kezdeti lépéseinél is igen fontos szerepet játszanak (Niehaus és Becker, 1998). A baktériumokat határoló LPS réteg a külső membrán egyik fő komponense, amely csaknem az összes Gram negatív baktériumban megtalálható, nélkülözhetetlen szerepe van a membrán épségének és stabilitásának megőrzésében. A membrán szabályozott áteresztőképessége hatékony védelmet nyújt a külső, környezeti stresszhatások ellen, így fontos a baktériumok életben maradásához és alkalmazkodásához a változó környezetben. Az *S. meliloti* kétféle, savas típusú exopoliszaharidot képes termelni, a szukcinoglukánt (EPS1) amely a szimbiózis kialakulásához is igen fontos és a galaktoglukánt (EPS2) amely képes az előzőt helyettesíteni az infekció során (Glazebrook és Walker, 1989).

Az NCR peptidek hatására csökkent expressziót mutató *acpXL*, *acpP*, *lpxC* és néhány *fab* gén megváltozott mennyiségű lipidA termelődését eredményezheti, amely a membrán LPS összetételét módosíthatja.

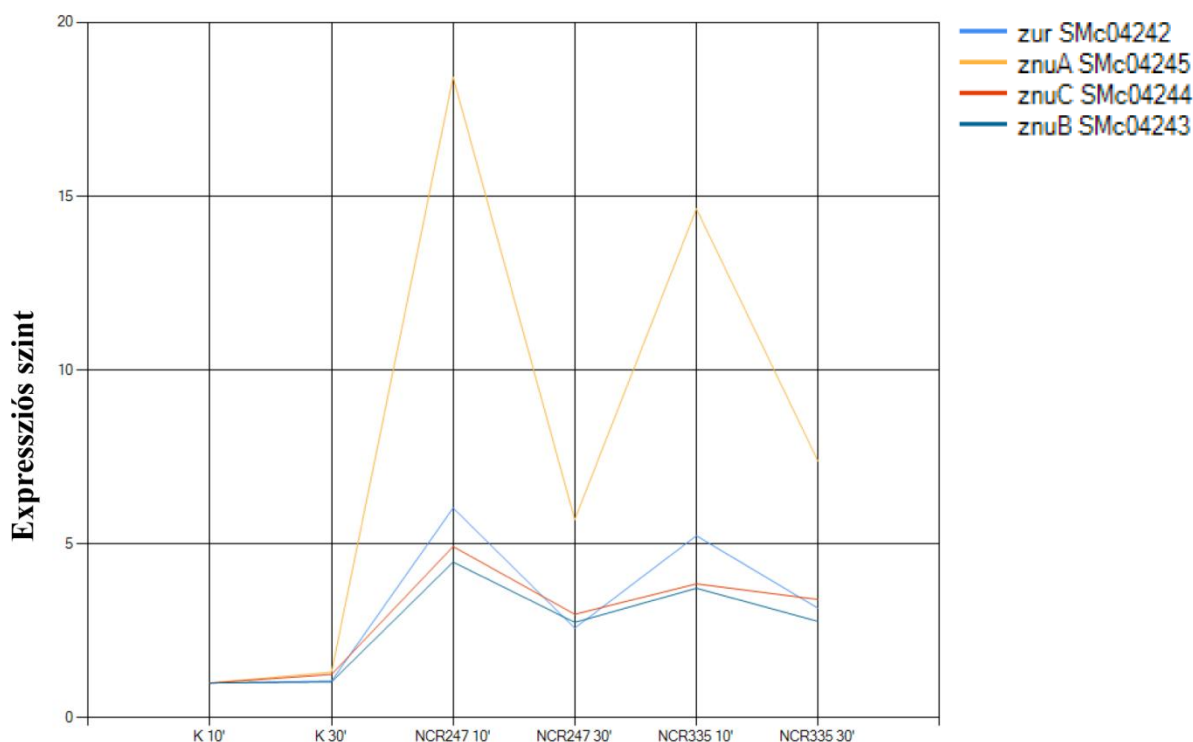
NCR335 peptid kezelést követően mindkét időpontnál (10 perc és 30 perces kezelés) a *mucR* gén alulműködése tapasztalható. A *mucR* egy cink-ujj protein, mely erősen konzervált a

Rhizobiales nemzetségen belül. Génterméke negatívan szabályozza az EPS2 szintézisét, ugyanakkor pozitív regulátora az EPS1-nek (Bahlawane és mtsai., 2008). A módosult bakteriális felszín képes megváltoztatni a sejt környezeti stresszel szemben mutatott ellenállását. A *mucR* által szabályozott transzkripciós egységek, vagyis az EPS1 termelésért felelős *exo* és az EPS2 termelésért felelős *wga*, *wgc*, *wgd*, *wge* gének expresszióban bekövetkező változása a 10 és 30 perces mintákban azonban nem mérhető.



22. ábra A *bacA* (Smb20999) gén expressziós szintjének változása az analízis során. Az *S. meliloti* baktériumban több mint kétszeresére emelkedett a *bacA* gén expressziója a 10 perces NCR247 kezelés hatására.

A BacA membrán protein működése szükséges a normális bakteroid fejlődéshez a gümőben. A BacA precíz *in vivo* rendeltetése jelenleg még nem tisztázott, de számos kísérlet bizonyítja, hogy jelenléte csökkenti a bakteriális membrán érzékenységét, többek között éppen az NCR-ekkel szemben (Haag és mtsai., 2011). Az NCR247 peptid hatására a 10 perces kezelésben a gén 2,5-szeres túlműködése figyelhető meg (22. ábra). A gén terméke feltehetően megakadályozza az NCR molekulák transzportját, ezáltal a jelentős mértékű membrán permeabilizációt és intracelluláris hatást (Oldroyd és mtsai., 2011).

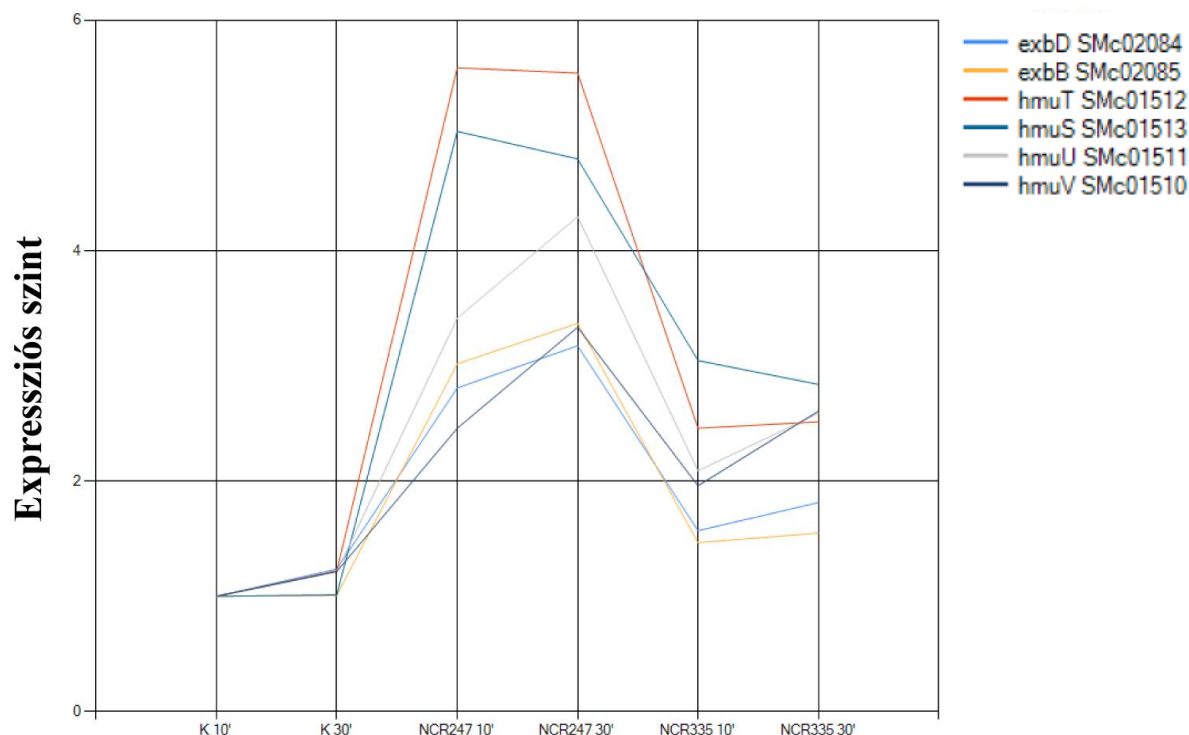


23. ábra A cink (Zn) transzportban szerepet játszó proteinek szintéziséért felelős gének (*znuABC*) és a szabályozást végző *zur* represszor expressziós szintjének változása látható az egyes NCR peptidek hatására, a különböző kezelési időtartamok feltüntetésével.

A baktérium Zn^{2+} felvételéért egy energiafüggő ABC transzporter felelős. A *znuABC* operon egy három fehérjéből álló komplex szintéziséért felelős. A *znuA* a periplazmatikus protein, a *znuB* a membrán-integrált egység és a *znuC* az ATPáz komponens. Az NCR247 és NCR335 gümő specifikus peptidek hatására mind a 10 perces, mind a 30 perces kezeléseknél magasan expresszált a *znuABC* operon (23. ábra). A Proteobaktériumokban az operon szabályozásáért a mintáinkban szintén upregulálódó Zur represszor felelős, amely a Fur protein család tagja. Számos protein (például riboszomális proteinek) és bakteriális enzim tartalmaz az aktív centrumában, vagy a strukturális felszínen cinket (például DNS polimerázok, proteázok, metalloenzimek), de fontos szerepet kapnak a bakteriális membrán stabilizálásában is (Hantke, 2001).

A vas nélkülözhetetlen elem számos anyagcsere folyamatban, például a nitrogénfixálás, a légzési folyamatok és DNS szintézis során is. Az NCR kezelése hatására kiugróan magas expressziót mutató *hmuSTUV* operon fontos a ferroxi-amin transzport során a *Rhizobiumok*ban (Cuiv és mtsai., 2008) (24. ábra).

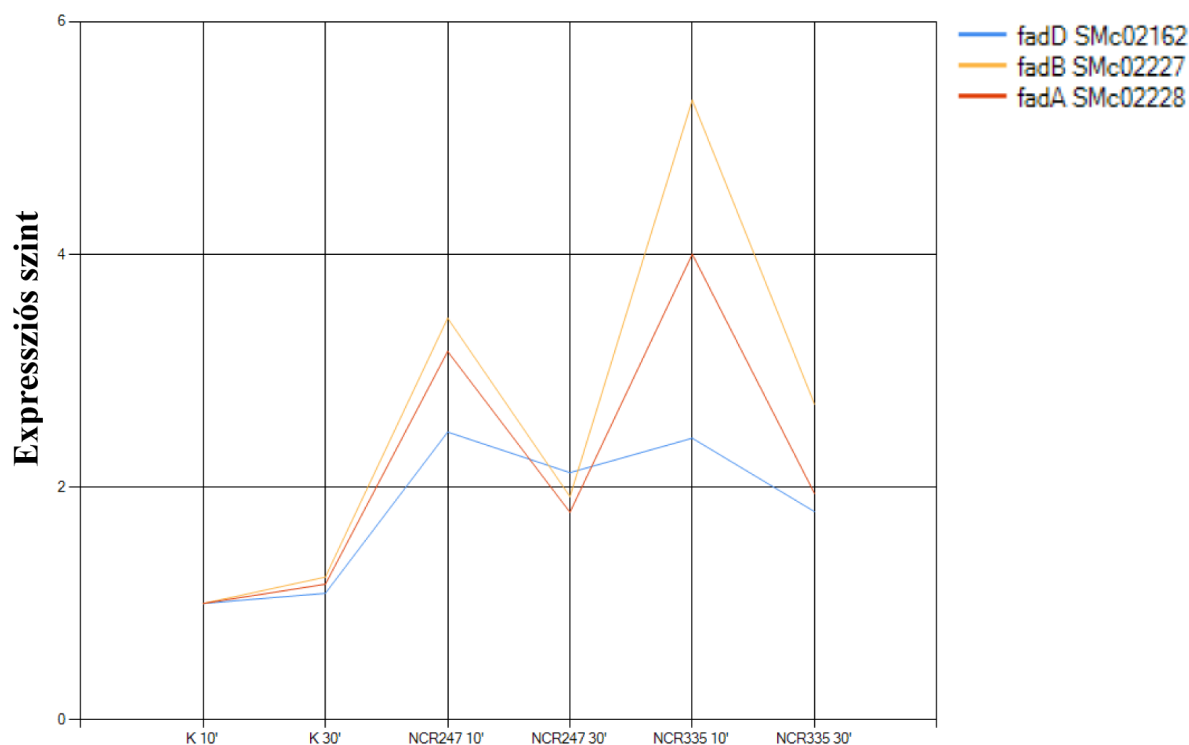
A szintén emelkedett expressziót mutató *exbBD* – a TonB-vel alkotott komplexben - szükséges a vas felvételéért. A vas homeosztázist szabályozó *irr* gén, mely egy általános regulátor, csak az NCR335 30 perces kezelésben éri el a kétszeres határértéknél magasabb transzkripciós szintet.



24. ábra A *hmuVUTS* és az azt szabályozó *exbBD* operonok expressziós változása az NCR peptidok hatására a kontrollokhoz viszonyítva, a kezelési idők feltüntetésével.

Mind azt NCR247 mind az NCR335 30 perces peptidkezelés megnövelte a *fecI* gén mRNS szintjét a mintákban. A *fecI* gén mint szigma faktor közvetíti az RNS polimeráz DNS-hez történő kapcsolását. A *fecI* aktiválásához szükséges a FecR vas transzport regulátor proteinnel történő interakció. A *fecR* gén aktivitása azonban körülményeinknél nem változott.

A zsírsav anyagcsere köztes és végtermékei szolgáltatják a lipopoliszaharidok szintéziséhez és a rhizobiális membrán felépítéséhez felhasználható komponenseket, valamint a szignál transzdukcióban résztvevő koenzimeket. A *fadAB* és *fadD* gének, valamint számos zsírsav anyagcseréhez kapcsolható hipotetikus funkciójú gén, mint például az *SMc00976*, *SMc00262*, *SMB20752* upregulációja figyelhető meg az NCR molekulák hatására. A *fadAB* és *fadD* gének expressziós szintű változásait szemlélteti a 25. ábra.



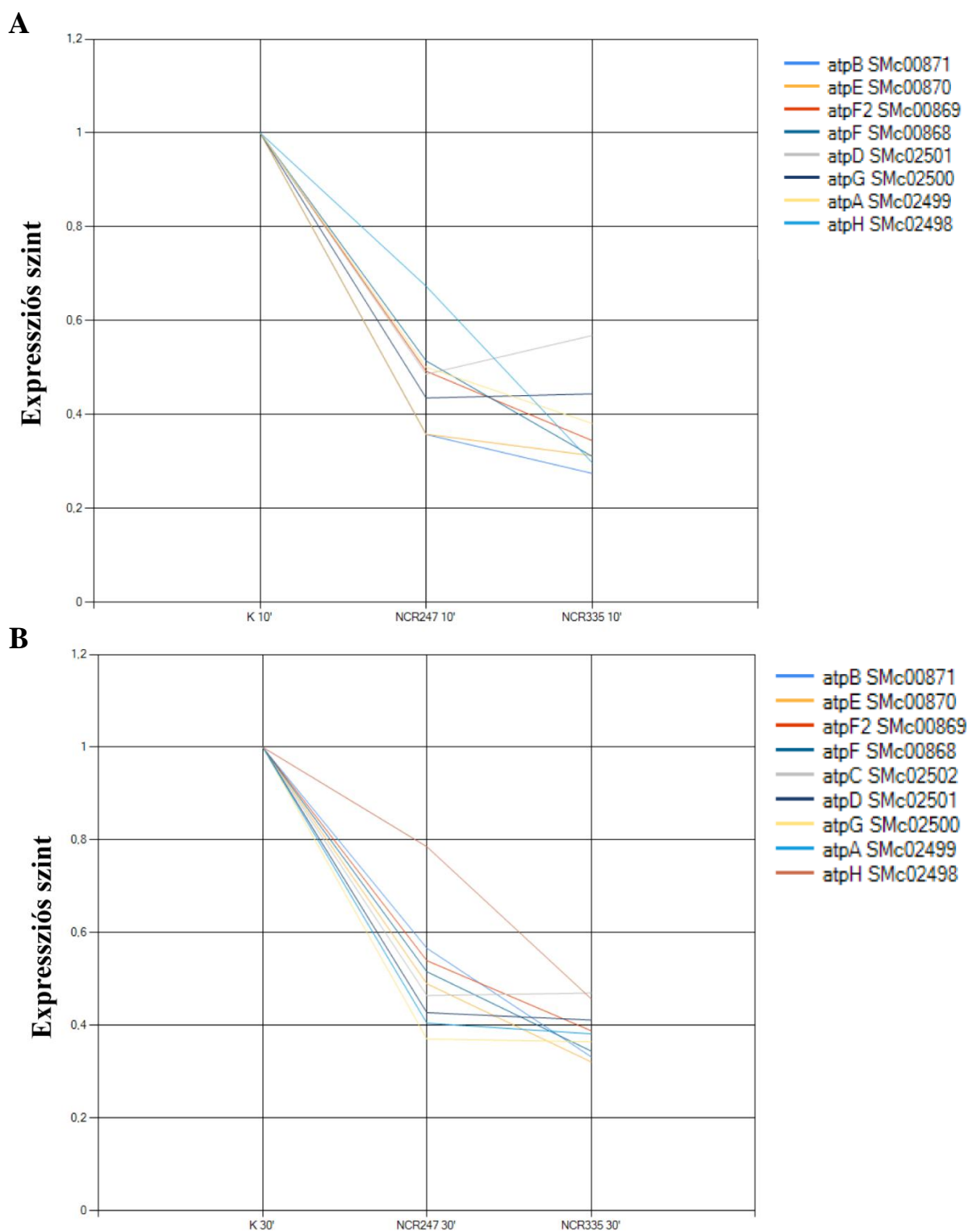
25. ábra A zsírsav anyagcsere néhány génjének változása az NCR247 és NCR335 kezelések hatására. Az *S. meliloti* *fadAB* és *fadD* génjeinek expressziós változása a 10 perces NCR247 és NCR335 kezeléseket követően hirtelen megemelkedett.

4.9.2. Az energiaszolgáltatás

A citrát (TCA) ciklus a fehérjék, a szénhidrátok és a lipid anyagcsere közös állomása, amely a sejt NADH és ATP szintjének utánpótlását végzi. Az NCR247 és NCR335 peptidkezelések következtében a TCA ciklus során szerepet játszó gének egy részének csökken az expressziója, mint például az. *icd*, *fumC*, *fdh*, *sucB*, *adhC1*, *SMc04270* és *adhA1*, míg másoknál jelentős emelkedést figyelhattunk meg, így a *sucA*, *sucC*, *sucD* és *Smb20857* esetében.

A redox folyamatok által létrehozott elektokémiai potenciál grádiens kapcsolt az ATP szintézis folyamatához. Aerob baktérium kultúrában a *Rhizobiumok* az oxidatív foszforiláció által termelik az ATP-t. Ezzel szemben a szimbiózis során átalakult bakteroidban az ATP szintézisért felelős gének represszált állapotban vannak (Becker és mtsai., 2004).

Az ATP szintézishez kapcsolt gének (*atpHAGDC*, *atpFF2EB*) erős downregulációját figyelhattuk meg az NCR247 és NCR335 peptidekkel történt kezelések hatására is (26. ábra).



26. ábra Az NCR247 és NCR335 peptidekkel kezelt *S. meliloti* transzkriptómában, az ATP szintézisért felelős gének expressziója jelentősen lecsökkent. Az (A) panel a 10 perces peptidkezelések hatására, a (B) panel a 30 perces NCR kezelések hatására, az ATPase gének expressziójában bekövetkező változás mértékét mutatja.

Az NCR335 peptiddel végzett kezeléseket követően a mintákban lecsökkent egyes NADH dehidrogenáz komponensek expressziója is (*nuoNK₁HL*).

Az *fbcFBC* operon három redox alegységet kódol. Az *fbcF* az Fe-S proteint, az *fbcB* a citokróm-b-t, végül az *fbcC* a citokróm-c1-et. Valamennyi kezelésben ezek a gének is represszált állapotban vannak a kontroll értékekhez képest.

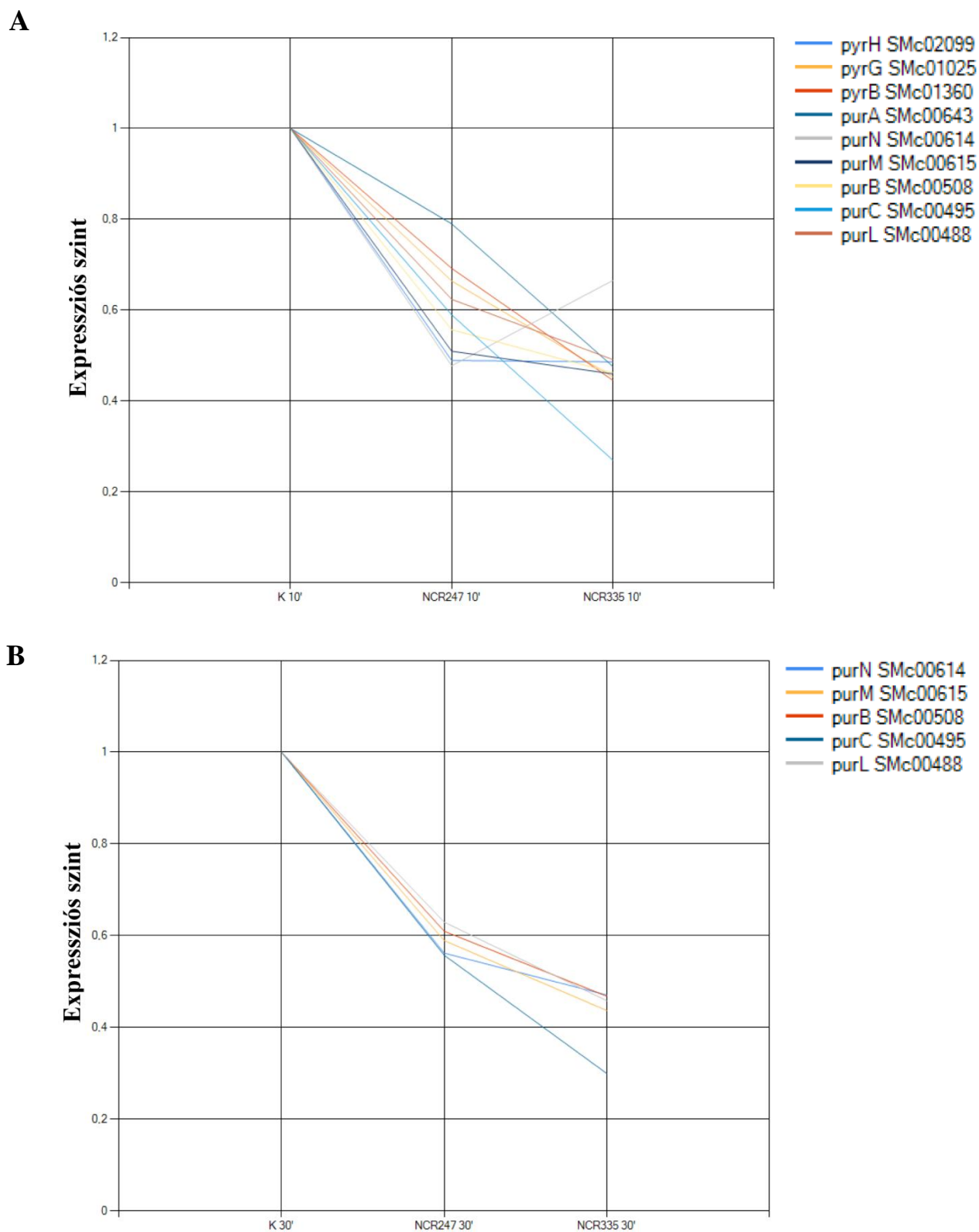
4.9.3. Genetikai információs folyamatokat érintő változások

A nukleotid bioszintézist érinti a purin- (*purABCNMLU3*) és pirimidin (*pyrBGH*) szintézisért felelős gének csökkent átírása (27. ábra).

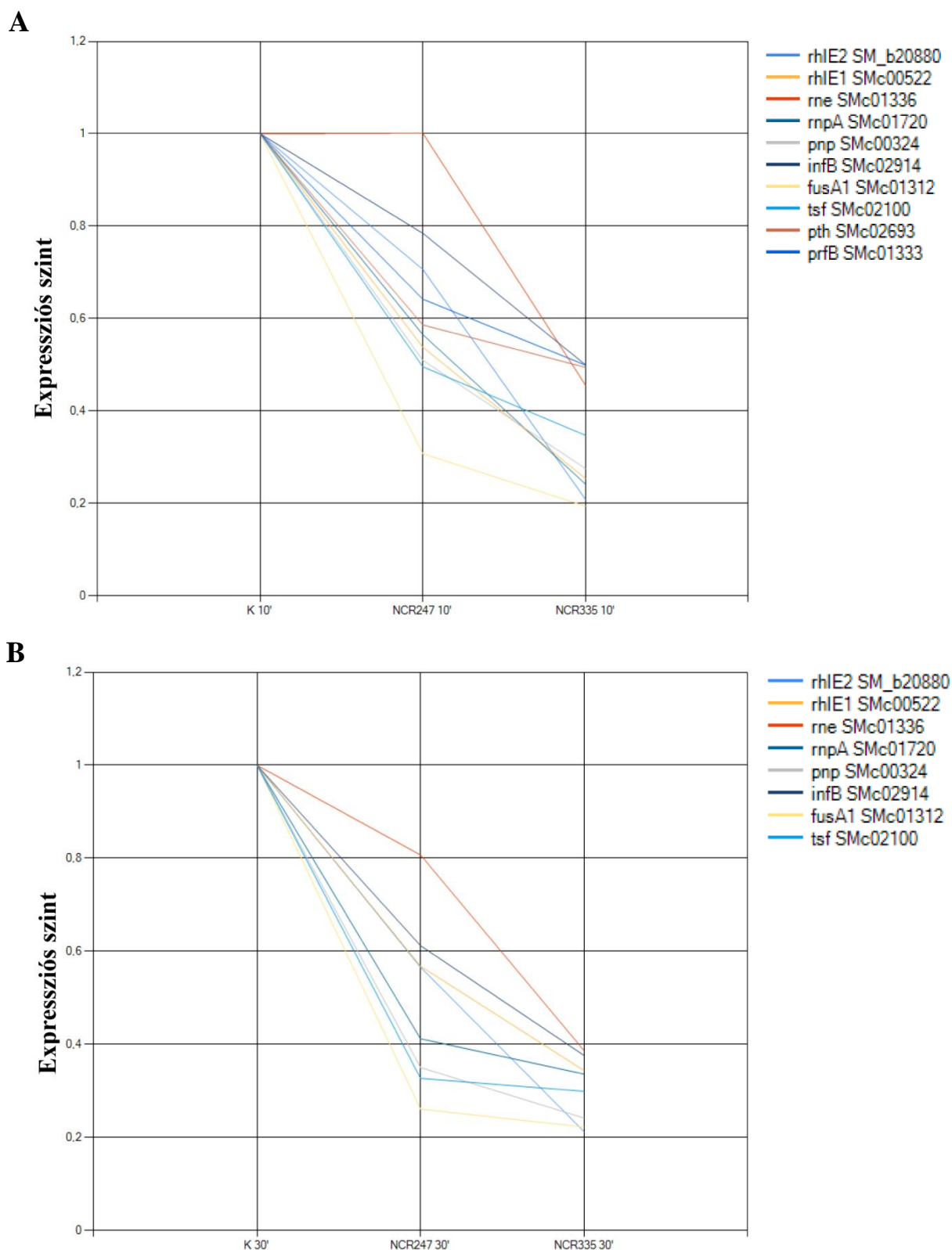
A transzkripciót érintően csökkent az RNS-polimeráz alegységek (*rpoABCZ*), a transzkripció terminátor (*rho*) és az antiterminátor proteint kódoló gének (*nusG*) mRNS szintje a mintákban.

A riboszóma biogenezisben szerepet játszó ATP-függő RNS-helikázok (*rhIE1*, *rhIE2*), az RNS molekulák processzálsban szerepet játszó gének (*rne*, *rnr*, *rnpA*, *pnp*) RNS szintű megnyilvánulása csökkent (28. ábra). Továbbá 53 db riboszómális protein gén expressziója gátlódott jelentős mértékben (29. és 30. ábra). A riboszómális proteinek ilyen mértékű repressziója a gümőből izolált bakteroidokban is hasonlóan megfigyelhető.

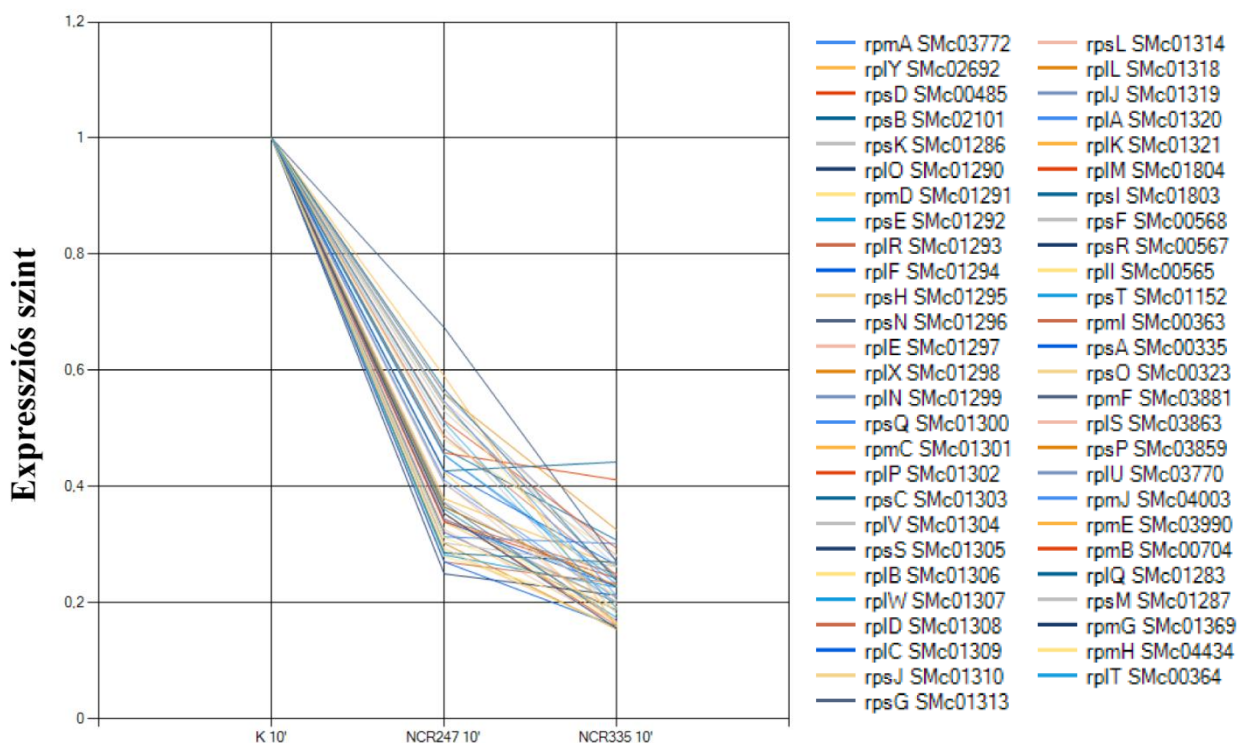
A translációt érintően csökkent több translációs iniciációs faktort (IF1-*infA*, IF2-*infB*, IF3-*infC*), elongációs faktorokat (*tuf1*, *tuf2*, *fusA1*, *tsf*) és riboszóma-asszociált saperon fehérjéket (*tig*) kódó gén aktivitása. Csökkent a génaktivitása néhány ATP-függő RNS helikáznak (*rhIE1*, *rhIE2*), polinukleotid-foszforiláznak (*pnp*) (28. ábra), nukleozid difoszfát kináznak (*ndk*). A protein szintézis gátolt működése más kapcsolódó folyamatokra is hattással van. Megfigyelhető például a kezelt mintákban az aminosav bioszintézis repressziója a *serB*, *lysA*, *thrA*, *leuB*, *pdh*, *aroQF*, *pheAa*, *aatA*, *dapA* gének alulműködése által.



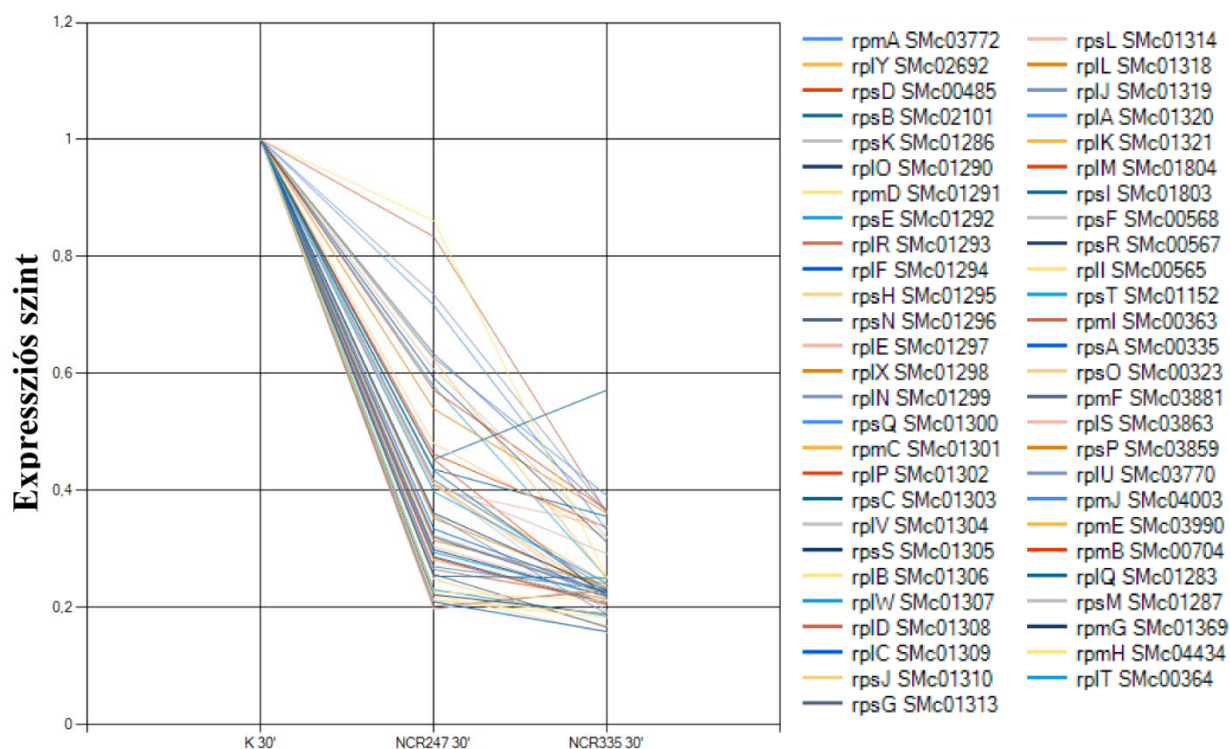
27. ábra A purin és pirimidin bioszintézisért felelős gének expressziójának csökkenése (A) 10 perccel az NCR247 és NCR335 peptidek hatására, valamint (B) 30 perces peptidkezeléseket követően.



28. ábra A riboszóma összeszerelésében szerepet játszó ATP függő helikázok (*rhIE1*, *rhIE2*), az RNS molekulák processzáálásában (*rne*, *rnr*, *rnpA* *pnp*) és a translációs folyamatokhoz (*infB*, *fusA1*, *tsf*, *pth* *prfB*) kapcsolódó gének csökkent expressziós működése detektálható az NCR247 és NCR335 peptidek hatására.



29. ábra A riboszomális proteinek expressziós változása a kezeléseket követő 10. percben. Az NCR247 és NCR335 peptidek hatására csökkent a riboszomális proteinek expressziója már 10 perccel a kezeléseket követően.

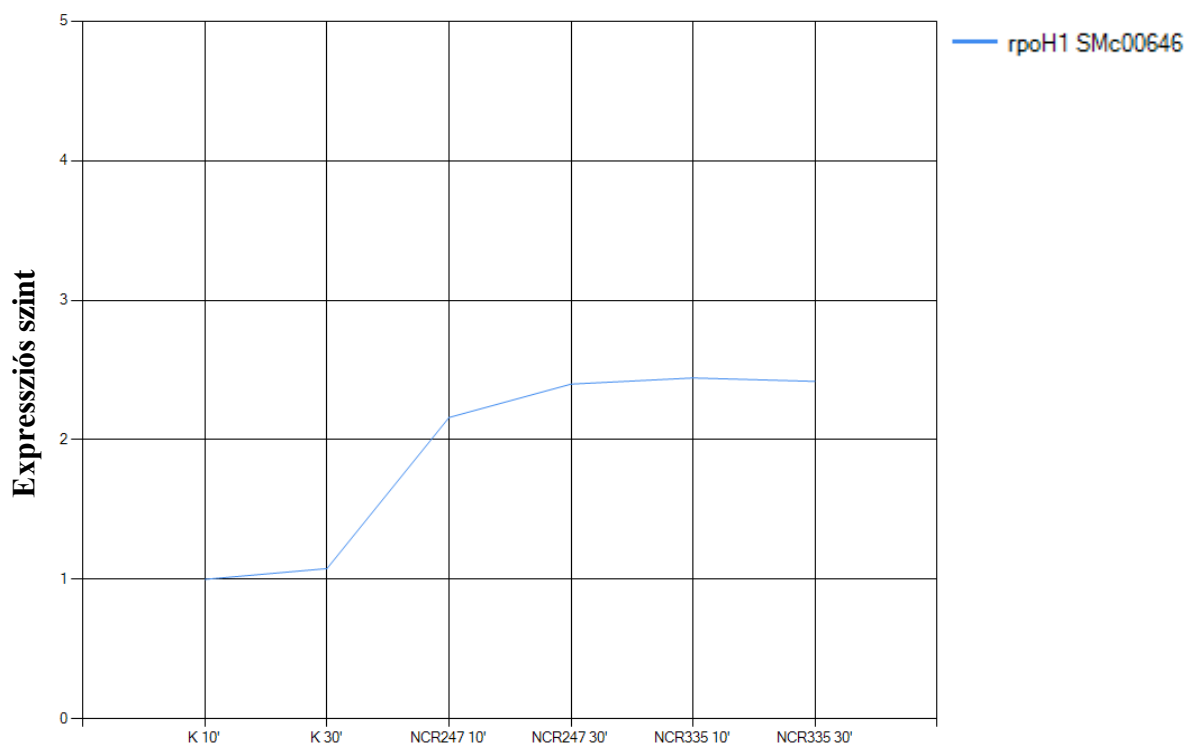


30. ábra A riboszomális proteinek expressziós változása a kezeléseket követő 30. percben. Az NCR247 és NCR335 peptidek hatására csökkent a riboszomális proteinek expressziója. Az ábra a 30 perces kezeléseket követően ábrázolja az egyes gének expressziós változását a kontrollhoz képest.

4.9.4. A stresszválaszhoz köthető génexpressziós változások

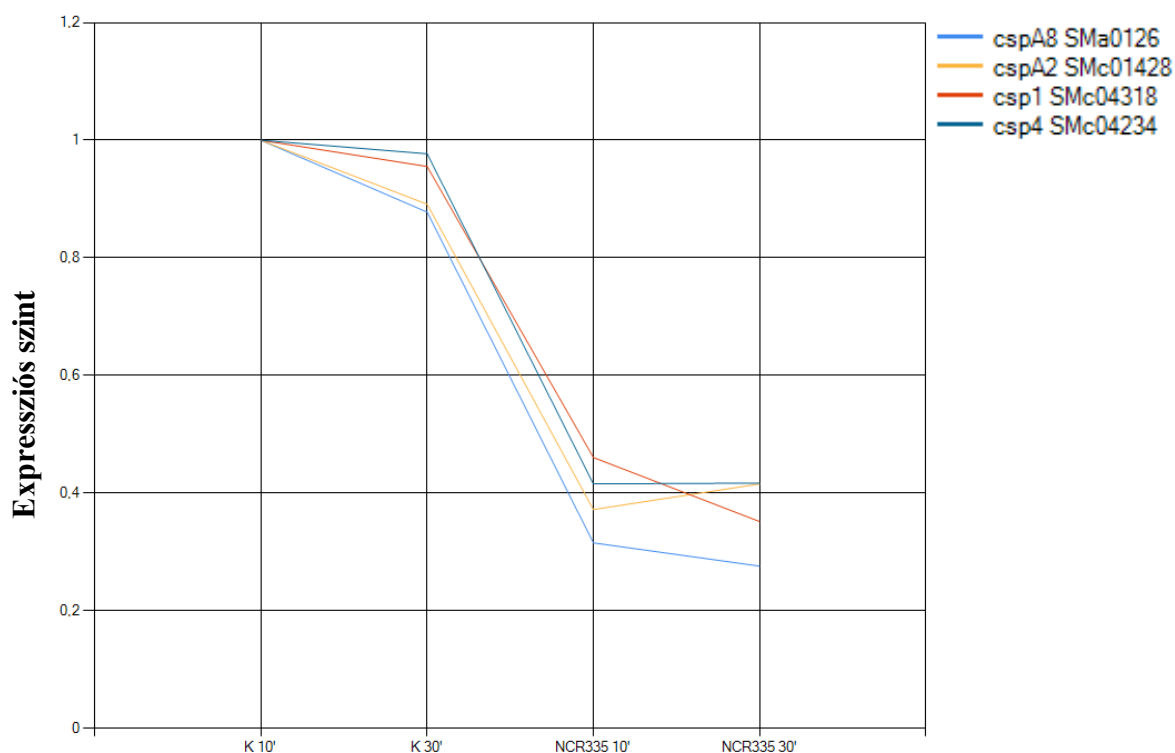
A környezeti stresszre adott válaszreakció és adaptáció több tucat gén expressziós változását eredményezi. Az *S. meliloti* genomban 14 alternatív szigmafaktor szabályozza a különböző gének működését és átírását. Ezek az RpoN, RpoH1, RpoH2, RpoE1-RpoE10 és a FecI (Finan és mtsai., 2001; Galibert és mtsai., 2001).

Az általunk vizsgált NCR peptidek a transzkriptóma adatai szerint mindössze két szigma faktor működésében eredményeztek változást a kezeletlen kontrollhoz képest. Az *rpoH1* gén, amely egy szigma faktor általában a pH változásra adott stresszválasz során aktiválódik. Emellett szerepe van a hősokk proteinek aktiválásában, valamint a szimbiózisban és a nitrogénfixálás során. Az *rpoH1* magas expressziója kimutatható *M. sativa* és *M. truncatula* gümőben élő bakteroidokban is. Az NCR247 és az NCR335 kezelések már 10 percet követően is aktiválták az *rpoH1* működését *S. meliloti* baktériumban (37A. ábra), ami később a 30 perces kezelésben mérsékelten fokozódott (31. ábra) Némely *rpoH1* által szabályozott gén működésében is megfigyelhető a fokozott aktivitás, például a *dnaJ*, *dnaK*, *clpB*, *groES*, *htpG*, *htpX*, *hslU*, *hslV*, *hslO*, *SMb21295*, *SMc01106*, *trxA*, *grxC*, és *msrA3* esetében.



31. ábra Az *rpoH1* gén mRNS szintjének változása a különböző kezelések hatására. Az NCR247 és az NCR335 peptid is megemeli az *rpoH1* szigma faktor expressziós szintjét mind a 10 perces mind a 30 perces kezelésekben.

A hideg-sokk fehérjéknek még nincs azonosított szigma faktora prokariótákban (Yamanaka, 1999). Néhány a csoportba tartozó gén, például a *csp1*, *cspA2*, *csp4* és a *cspA8* expressziója jelentősen lecsökkent az NCR335 kezelés hatására mind a 10 perces, mind a 30 perces mintában (32. ábra).



32. ábra Hideg-sokk fehérjék expressziós változása az NCR335 peptidkezelés után. A *csp2*, *cspA8*, *csp1* és *csp4* hideg-sokk fehérjék mRNS szintje jelentős csökkenést mutatott az NCR335 peptid hatására.

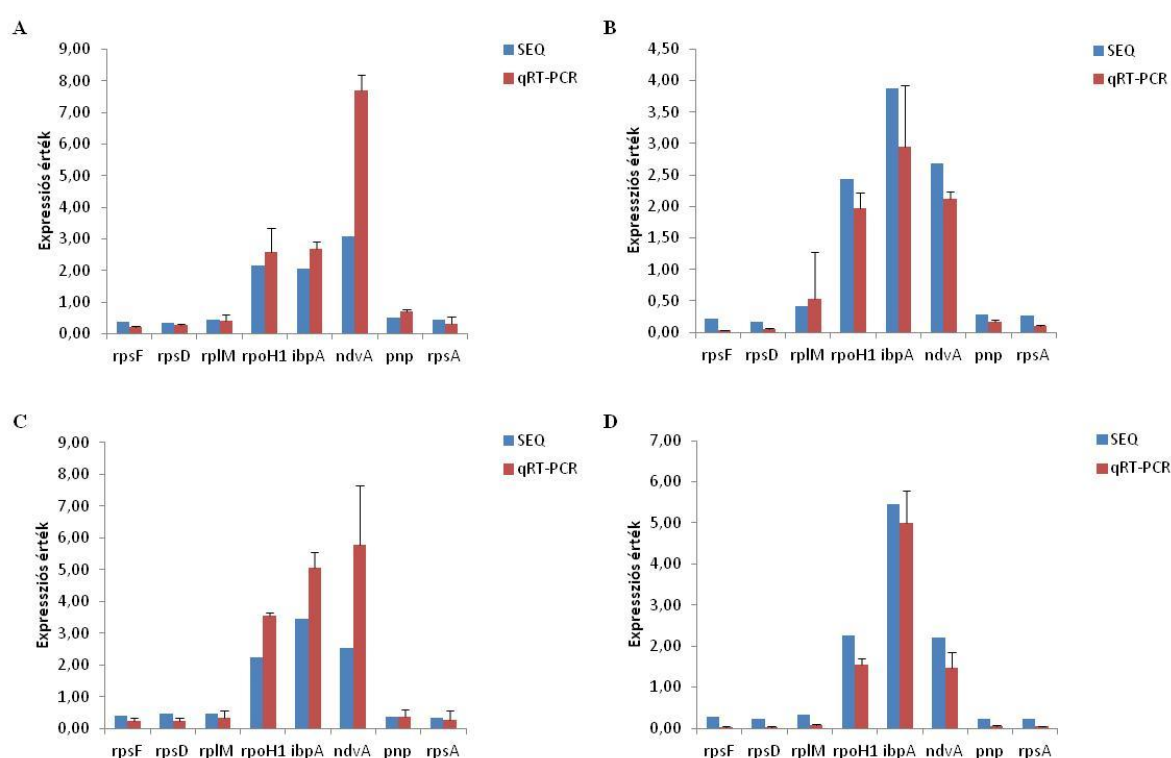
Az *S. meliloti 1021* baktérium az oxidatív stressz ellen szuperoxid-diszmutázokat és katalázokat termel (Santos és mtsai., 1999). A *katA* gén normál körülmények között az exponenciális növekedési fázisban termelődik. Az NCR335 hatására azonban mind a 10 perces, mind a 30 perces kezelt mintákban jelentősen megnő a róla átíródó RNS mennyisége a kontrollhoz képest. A *katA* gén magas expressziója a bakteroidban is megfigyelhető és elsődleges szerepe a hidrogén-peroxid degradációjához köthető (G. P. Ferguson és mtsai., 2004).

A 30 perces NCR335 peptiddel kezelt *S. meliloti 1021* mintában a *sodC* gén mRNS szintjének emelkedése detektálható. A természetben ez a gén az infekciós folyamatok során aktiválódik. A génről átíródó fehérje kiemelt feladata a természetben a bakteriális sejtfal védelme a szuperoxid-ionokkal szemben.

4.10. A szekvenálási adatok megerősítése

Az RNS szekvenálás eredményeinek ellenőrzése (validálása) valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR) történt.

Az ellenőrzéshez riboszomális proteinek (*rpsF*, *rpsD*, *rplM*), egy alternatív szigma faktort (*rpoH1*), egy hősokk proteint (*ibpA*), egy ABC transzportert (*ndvA*) és egy poliadeniláz enzimet (*pnp*) kódoló gént választottunk. Belső kontrollnak a *16S RNS*-re terveztünk primereket.



33. ábra A szekvenálási eredmények megerősítése qRT-PCR reakcióval. Az (A) grafikon az említett bakteriális gének szekvenálásban és qRT-PCR-ben mért expressziós szintjét ábrázolja NCR247 peptiddel történő 10 perces kezelést követően, (B) NCR335 peptiddel történő 10 perces kezelést követően, (C) NCR247 peptiddel történő 30 perces kezelést követően és (D) NCR335 peptiddel történő 30 perces kezelést követően. A grafikonokon feltüntetett qRT-PCR adatok három biológiai és azok két technikai párhuzamosainak mérési eredménye, a szórás feltüntetésével.

A qRT-PCR reakciókhoz használt cDNS templátokat a mintánként (6 különböző minta) három biológiai párhuzamosból tisztított RNS-ekből írtuk (18 különböző cDNS). Az

ellenőrző kísérlethez kiválasztott géneknek (7 darab) az expresszióját valamennyi mintában leellenőriztük reakciónként 2-2 technikai párhuzamost alkalmazva. A qRT-PCR-ben kapott C^T értékekből génexpressziót számoltunk. Ezeket a számolt értékeket foglaltuk össze a 15. függelékben.

A qRT-PCR-ben az egyes génekre kapott expressziós értékeket (a biológiai párhuzamosok között mért szórásokkal) hasonlítottuk össze a szekvenálásból származó adatokkal melyeket grafikonon (33. ábrán) ábrázoltuk.

Az ellenőrzéshez használt gének qRT-PCR-ben mért expressziós értékei alátámasztják és megerősítik a szekvenálás során kapott változásokat.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A Galeoid klád tagjainak a *Rhizobiumokkal* kialakított szimbiotikus kapcsolata során kitüntetett szerepe van az NCR peptideknek a gümőben élő baktériumok terminális differenciálódásában. Megnéztük az izoelektromos pontjuk alapján a peptidcsalád széles skáláját jellemező (PI 3,61-11,22), 14 különböző NCR molekula hatását CFU tesztben szabadonélő *S. meliloti 1021* baktériumon (*ex planta*). Az eredményeket összegezve levontuk azt a következtetés, hogy az NCR peptidek egy jól jellemezhető csoportja, a kationos tulajdonságú NCR molekulák, esetünkben az NCR335, NCR247, NCR137, NCR192, NCR035 és az NCR055 antimikrobiális hatással rendelkeznek *in vitro*. Az antimikrobiális hatás bizonyításához kiválasztottunk a vizsgált peptidekből kettőt a további kísérletekhez.

Az NCR247 és NCR335 peptidek (50µg/ml/3óra) a Gram-pozitív (*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) és Gram-negatív baktériumok (*Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*) széles skáláját pusztították el rövid idő alatt, vagyis sejtölő, antimikrobiális hatást fejtettek ki *in vitro*. A vizsgált baktériumok többsége valamely kezelés hatására teljesen elpusztult. A *Xanthomonas campestris* és a *Clavibacter michiganensis* bizonyultak a legérzékenyebbeknek, hiszen ezek a növényi patogének egyik kezelést követően sem voltak képesek telepformálásra. Mivel a dolgozatomban bemutatott két cisztein-gazdag gümő-specifikus peptid hatékonyan semmisített meg számos human/állati és növényi patogén baktériumot, így ezek lehetséges jelöltek lehetnek a jövőben a gyógyászatban, vagy akár az élelmiszer iparban a kórokozók elleni védelemben. Figyelembe véve, hogy a peptidcsaládot alkotó közel 600 NCR molekula közel fele kationos tulajdonságú, a *Medicago* gümő a potenciális antibiotikum jelöltek valóságos “kincstára” lehet. A legfontosabb kérdés ezzel kapcsolatban, hogy vajon hogyan fejtik ki hatásukat?

Propidium-jodid (PI) teszttel igazoltuk az 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml növekvő peptid koncentrációk által időfüggően indukált (10 perc, 30 perc, 120 perc) membránáteresztő képesség növekedést, ami összhangban van a korábbi kísérletekben tapasztalt sejtölő hatással.

Az NCR247 és NCR335 peptidek által indukált génexpressziós változások vizsgálataihoz és az esetleges intracelluláris célpontok felderítéséhez transzkriptom analízist terveztünk (SOLiD4 Life Technologies rendszert alkalmazva) a peptideket termelő *M. truncatula* természetes körülmények között kölcsönható szimbiotikus partnerén (*S. meliloti 1021*), olyan alacsony peptidkoncentrációt (10 µg/ml) és kezelési időtartamot választva (10 perc, 30 perc), melyeknél megfigyelhettük a baktérium sejtek korai válaszát, azok jelentős pusztulása nélkül.

Az elemzés során megvizsgáltuk a *S. meliloti 1021* közel 6700 fehérjét kódoló génjének expressziós profilját. A több száz változó működést mutató gén között a génexpresszió csökkenésével jellemezhető gének legnagyobb csoportja a genetikai információk folyamatok része. A transzkripciót érinti például az RNS-polimeráz alegységeket kódoló *rpoABCZ*, a transzkripció terminátor *rho* és az antiterminációs *nusG* gén fehérjeterméke. A translációs iniciátorokat *IF1-infA*, *IF2-infB*, *IF3-infC*, elongációs faktorokat *tuf1*, *tuf2*, *fusA1*, *tsf* és majdnem az összes riboszóma asszociált fehérjét kódoló gén (53 darab) és alegység (*rps*, *rpm* és *rpl*), valamint a riboszóma biogenezishez kapcsolódó *hflX*, *engD* expressziója csökkent a kezelések hatására. A konformáció módosítást és az RNS molekulák érését végző proteinek (ATP-függő RNS helikázok *rhlE1*, *rhlE2*; ribonukleáz E, P; polinukleotid foszforiláz/poliadeniláz *pnp*) expressziója szintén csökkent. A purin és tiamin bioszintézis enzimeit kódoló gének expressziója szintén csökkent a rövid ideig tartó kezelésekben. A foszfát-csoportok cseréjét katalizáló nukleotid-difoszfát kináz génje (*ndk*), szintén csökkent aktivitást mutatott az NCR peptidekkel kezelt mintákban. A másik nagy csoport, melyben nagy számú gén működése negatívan érintett, az oxidatív foszforiláció és a zsírsav bioszintézis. Ide tartoznak az ATP-szintetáz elemei, a citokróm bc₁ komplex és további hat gén, melyek a zsírsav bioszintézis enzimeit kódolják. Nagyszámú ABC transzporter, köztük a kadmium, spermidin/putrescin export elemek szintén gátlás alá kerültek a kezelések hatására.

A magasabb mRNS szintet mutató gének között azonosítottuk az *ibpA*, *rpoH1* stresszválaszhoz kapcsolható géneket, melyek különböző stressz fehérjéket kódolnak. Az ATP-függő proteázokat kódoló *msrA*, *clpB* és *hslV* gének szintén indukálódtak. A transzkripció regulátorok csoportjában mintegy 24 gén, a membrán transzport folyamatokhoz kapcsolódóan pedig 42 gén mRNS szintje nőtt meg a vizsgált NCR peptidkezelések hatására. Jelenleg sajnos nem ismerjük a legtöbb membrántranszporter szubsztrát molekuláját. Ez alól kivétel a Zur represszor által regulált *znuABC*, mely felelős a cink szabályozott felvételéért, de a vas felhasználás során szükséges FoxA-FhuFP-HmuSTUV proteineket kódoló gének expressziója

is nőtt. Az általunk vizsgált két kationos NCR molekula elsődleges célpontja a negatív töltésű bakteriális membrán. A membrán összetételét átalakító lipid komponenseket kódoló gének változása a körülményekhez való alkalmazkodást célozza. Nagy számban változott, többségében megnőtt a membrán transzport folyamatokhoz köthető gének expressziója, melyek a szükséges tápanyagok, ionok felvételét, valamint a toxikus komponensek sejtből történő kipumpálását végzik. Az NCR247 és NCR335 peptidek legjelentősebb intracelluláris célpontjai a transzlációs rendszer részei. Az érett és funkcionális riboszóma felépítésében jelentős szerepet betöltő proteinek-, valamint a riboszóma összeszerelését végző peptideket kódoló gének repressziója általános mindkét vizsgált NCR peptid esetén. Mindezek a változások csökkent transzlációs aktivitást, alulműködő fehérje szintézist eredményeznek.

A kétszeres határértéket meghaladó génexpressziós változások egy jelentős csoportja csak az egyik peptidkezelést követően volt mérhető a transzkriptómában. Ezek között kereshetjük az egyes peptidek valódi specifikus célpontját, vagy közvetlen kölcsönható partnerét, illetve partnereit. Ezeknek a molekuláknak a pontos meghatározása azonban további vizsgálatokat kíván a jövőben.

Az analízisben alkalmazott körülményeknél azonban elmondhatjuk, hogy az NCR335 peptid specifikus indukáló hatása érvényesül a lipid anyagcseréhez kapcsolódó *pccB*, *SMA0151*, *cfa2*, *SMc02636*, *tesA* gének változásában, a citromsavciklus egyes tagjainál (*sucACD*) és több hőszokk fehérjét kódoló génnél, például a *hsp20*, *groES*, *groEL*, *dnaJ*, *SMc01106* és a DegP3 proteáz esetében. Közvetve, vagy közvetlenül represszálja az RNS degradációhoz kapcsolódó *rhIE2*, *rne*, *rho* géneket és az oxidatív foszforiláció néhány elemét (*atpF*, *atpH*, *fbcB*, *fbcF*, *ppa*, *nuoK1*). Csökken az expressziója egyes aminosav anyagcsere komponenseket (*aroQ*, *pyrBG*, *serB*, *SMB20821*, *dapA*, *lysA*, *thrA*) és hideg-sokk fehérjéket kódoló géneknek (*csp1*, *csp4*, *cspA2*, *cspA8*).

Az NCR247 peptid specifikus upreguláló hatása érvényesül például a membrán-transzport folyamatokban, köztük több ABC transzporter alegység átíródását befolyásolva, így az *fbpC1* (Fe^{3+} ion felvétel), *SMB20156*, *SMB21431*, *SMc03119*, *emrE*, *exbBD*, *rhra*, *SMc02589*, *SMc02156*, *SMc00784*, *SMB21432* génekét, valamint a protein lokalizációban és protein transzportban szereplő *exbB*, *exbD* és az *SMc01515* génekét. Génaktivitás csökkenést eredményez ugyanakkor az *lpxC* membrán komponens bioszintézisében, a hisztidin anyagcseréhez köthető *hisH* működésében vagy a protein szekréció *ffh* elemében.

A transzkripció elemzéshez kiválasztott NCR peptidek bakteriális partneren indukált hatásai sok tekintetben hasonlítanak egymáshoz. Ugyanakkor az NCR335 peptid egy erősebb

hatást és hevesebb válaszreakciót váltott ki, amit a kezeléseket követő CFU teszt és a propidium-jodid próba is alátámasztott.

A *Rhizobium* baktériumok és a pillangósvirágú növények szimbiotikus kapcsolata jelentős számú gén megváltozott működését eredményezi, melyek a zavartalan együttélést és hatékony nitrogénkötést teszik lehetővé. A gümőben a baktériumok bakteroiddá történő átalakulásában meghatározó szerepet töltenek be az NCR géncsalád tagjai. Talán nem véletlen, hogy a vizsgálatainkhoz választott NCR247 és NCR335 peptidek a szabadon élő *S. meliloti* 1021 baktériumban hasonló irányú változásokat is indukáltak, mint amit a gümőből izolált bakteroidokban mértek. Példaként említhetjük az energiaszolgáltatás útvonalaihoz tartozó *gap*, *nouL*, *nuoN*, *fbfF*, *ctaE*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpC*, *atpI*, *atpB*, *atpE*, *atpF2*, *atpF* gének represszióját, mely gének többek között az ATP és NADH szintézis során töltenek be alapvető szerepet. A bakteroidban és az NCR kezelt *S. meliloti*-ban is represszáltak a *prsA*, *purC*, *guaB*, *adk*, *ndk*, *dnaA*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoZ*, *greA*, *nusG*, *infA*, *infB*, *infC*, *efp*, *tufA*, *tufB*, *fusA1*, *prfB*, *alaS*, *aspS*, *SMa0677*, *SMc00762*, *SMc01950*, *lpxA*, *acpX*, *feuQ*, *feuP*, *ndvA*, *ndvB*, *tpsO*, *nex18* gének. Az NCR247 és NCR335 peptidekkel kezelt *Sm1021* transzkriptomban és a nitrogénfixáló gümőből izolált bakteroidokban is upreguláltak az *SMa0677*, *SMa0835*, *nodL*, és *SMb21295* gének. Az upregulálódó *katA* kataláz a bakteroidban a hidrogén-peroxid ellen véd, a transzkriptomban magas expressziót mutat a peptidek hatására, úgymint a *sodC*, amely normálisan az infekciós folyamatok során aktiválódik és feladata elsősorban a sejtfal védelme.

Az *rpoHI* szigma faktornak a különböző sokk hatásokra adott válaszok mellett, a szimbiózis során is nagy szerepe van. A kísérletben túlműködő *rpoHI* gén a gümősejtekből izolált bakteroidokban is erősen expresszál.

A gümő oxigén-limitált körülményei között magas expressziós aktivitást mutató és főleg a nitrogénkötés során aktív *nir*, *nor*, *nap* gének, *fixJ*, *nifA*, *fixK* valamint a *nif* és a *fix* regulon, a normál oxintenzió mellett alacsony expressziós aktivitást produkál (Soupene és mtsai., 1995).

Az ATP szintetáz gének (*atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpC*, *atpI*, *atpB*, *atpE*, *atpF2*, *atpF*) alacsony expressziója és a nagyszámú (53 db) riboszomális proteint kódoló gén repressziója szintén a gümőből izolált bakteroidok jellemző sajátja, ugyanakkor az általunk vizsgált NCR-ek által is kiváltott folyamat (Becker és mtsai., 2004).

A 7. táblázat összefoglal néhány *S. meliloti* gént a transzkriptom adatokból, melyek expressziós változása a gümőből izolált bakteroidokét tükrözi.

Az *in vitro* kísérletekben megfigyelhető, drasztikus változások az NCR molekulák hatására, jóval árnyaltabban zajlanak a *M. truncatula* gümő által biztosított védett, természetes közegben. A növényi sejtekbe bejutó *Rhizobium* baktériumok küldetése az aktív anyagcserét igénylő nitrogén-fixálás. Ezzel gyakran ellent mond a szabadon élő, peptiddel kezelt sejtek csökkent légzési aktivitása és esetenként csökkent életképessége, esetleg pusztulása. A mérhető különbségek és ellentmondások feloldására számos magyarázat található, melyek egy része még bizonyításra vár.

| Funkció | Represszált gén a bakteroidban/transzkriptomban (WTA) | Indukált gén a bakteroidban/transzkriptomban (WTA) |
|------------------------|--|--|
| Háztartási gének | <i>prsA, purC, guaB, adk, ndk, dnaA, rpoA, rpoB, rpoZ, greA, nusG, infA, infB, infC, efp, tufA, tufB, fusA1, prfB, alaS, aspS</i> , 53 db riboszómális proteint kódoló gén | <i>priA, nex18</i> (NCR247-10') |
| Adaptálódás | <i>phoE</i> | <i>katA</i> , SMb21295, <i>sodC</i> |
| Energetikai folyamatok | <i>gap, nuoK, nouL, nuoN, fbcF, ctaE, atpH, atpA, atpG, atpC, atpI, atpB, atpE, atpF2, atpF</i> | |
| Szimbiózis | SMa0677 (NCR335), SMc00762, SMc01950 (<i>livM</i>), <i>lpxA, acpX, feuQP, ndvA, ndvB, tpsO, nex18</i> | SMa0677 (NCR247), SMa0835, <i>nodL</i> , |

7. táblázat A peptidkezelések során a bakteriális genomban bekövetkező génváltozások összehasonlítása a bakteroidban tapasztaltakkal. Az NCR247 és NCR335 peptidek által kiváltott génexpressziós változások több esetben hasonlítanak a gümőből izolált *S meliloti* bakteroidban tapasztaltakkal. A változás irányát a szabadon élő baktérium génaktivitásához viszonyítottuk.

Az *in vitro* vizsgálatok során alkalmazott peptid koncentrációk például többszörösen meghaladják a gümőben termelődő mennyiségüket, mindamellett talán nem véletlen a több száz (ma már közel 600 azonosított) különböző tulajdonságú NCR peptid jelenléte a megfelelő helyen és megfelelő időben a gümő fejlődése során, hiszen ezek összehangolt működése együttesen váltja ki az átalakult, mégis életképes baktériumok jelenlétét. Az

gümőkben uralkodó alacsony oxigén szint (~2%) szintén számos magyarázat kiindulópontja lehet.

Az általunk vizsgált növényi eredetű, *in vitro* antimikrobiális NCR peptidek széleskörű hatásmechanizmusa több napjainkban használatos antibiotikum hatását egyesítik. Befolyásolják a peptidoglükán szintézisét, ahogy a penicillin, bacitracin, vankomicin, gátolják a fehérjeszintézist hasonlóan a tetraciklinekhez, sztreptomycinhez, eritromycinhez, hatnak a sejtmembránra (poliének, ciklopeptidek), a DNS függő RNS polimerázra (rifampicin) és a DNS replikációra is ahogy a különféle citosztatikumok.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre az AMP típusú molekulák transzkriptóm szintű hatásainak tanulmányozására. Az általunk tapasztalt transzkripciós változásokat összehasonlítottuk különböző publikációkban talált antibakteriális peptid és hatóanyag mikroorganizmusokon kiváltott hatásaival. A daptomicin például mely egy savas, ciklikus lipopeptid csökkentette a transzkripciós-transzlációs rendszer működését a Gram-pozitív *S. aureus* sejtekben, továbbá gátolta a spermidin/putrescin transzportereket kódoló gének működését, ugyanakkor nem volt hatással az ATP szintetáz alegységekre (Tally és mtsai., 1999).

A membrán depolarizációt okozó karbonil-cianid *m*-klorofenilhidrazon (CCCP) hatóanyag csökkentette az *S. aureus* baktérium transzkripciós-transzlációs aktivitását, valamint az ATP szintetáz gének működését, hasonlóan ahogy mi tapasztaltuk az *S. meliloti* 1021 transzkriptomban az NCR peptides kezeléseket követően.

Bár a *Lactococcus* által termelt bacteriocin nisin (Breukink és de Kruijff, 1999) a peptidoglükán bioszintézist támadja (Breukink és mtsai., 1999) és pórusokat képez a bakteriális membrán felszínén (Hasper és mtsai., 2006), a daptomycinre és CCCP-re jellemző génexpresszió változások *S. aureusban* nem következtek be, illetve jóval mérsékeltebbek voltak.

A cathelicidin LL-37 peptid (Sorensen és mtsai., 2001) csökkenti az RNS polimeráz és helikáz gének, a riboszómális alegységek, a transzláció iniciációs és elongációs faktorokat kódoló gének kifejeződését *S. pneumoniae*ban (Majchrzykiewicz és mtsai., 2010), hasonlóan ahhoz amit az *S. meliloti*ban tapasztaltuk az analízis során az NCR peptidek hatásaként. Ezek az expressziós gátlások azonban nem csak kizárólag az AMP és AMP-szerű peptidek hatásai lehetnek, hiszen hasonlóakat írtak le rövid ideig tartó- és elnyúló hidrogén-peroxid kezelésekre hatására is *B. japonicum*ban (Jeon és mtsai., 2011). A különböző stressz hatásokra indukálódó saperonokat, proteázokat, metionin-szulfoxid reduktázokat és szigma faktorokat kódoló gének

magasabb mRNS szintjét, vagy az oxidatív stressz által indukált tioredoxint, glutaredoxint és a glutation S-transzferázokat ugyancsak megfigyelhetjük ezekben a folyamatokban. A stressz körülményeihez való alkalmazkodás érdekében a sejtek számos transzkripciós faktort és membrán-transzportert kódoló gén expresszióját is megnövelték. Az NCR kezelések esetében számos emelkedett szintű expressziót mutató transzkripciós regulátort kódoló gén kapcsolt volt membrán-transzportereket kódoló génekhez, operonokhoz, ami közös regulációra utal. Összevetve az AMP típusú, antimikrobiális hatású peptidekről talált irodalmat a mi transzkriptom eredményeinkkel, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy igen hasonló génexpressziós változásokat váltanak ki, melyek végül a baktériumsejt sérüléséhez vagy halálához vezethet. Nagy különbségeket találhatunk azonban az egyes kiváltott hatások erősségében, a cél-szervezetek spektrumában valamint a célgének számában.

Megfigyeléseinkre alapozva, úgy tűnik, hogy a defenzin-szerű NCR peptidek, melyek a növényben (*in planta*) felelősek a baktériumok differenciálódásáért antimikrobiális hatásúak *in vitro*, zavarva a bakteriális sejtmembránt például pórusokat formálva és azzal, hogy megváltoztatják a membránpotenciált. A membránintegritás változását alátámasztja, hogy a peptidekkel történt kezeléseket követően, detektálható a membrán-impermeábilis PI felvétele. A membránintegritás és a membránpotenciál elvesztése vezethet a sejt részéről a különböző stressz válaszokhoz, amely a sejt anyagcseréjének lassulását, valamint a sejtosztódás gátlását eredményezi. A magasabb koncentráció és/vagy a peptidekkel szembeni hosszabb kitettség a sejt halálához is vezethet.

Az NCR peptidek hatásmechanizmusának felderítése tehát nem csak tudományos és ökológiai szempontból érdekes és fontos, hanem átfogó, élettani folyamatokat érintő hatásai révén, mint potenciális új hatású antibiotikumok, megnyithatnak egy gyakorlati hasznosítás irányába vezető utat is a jövőben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kereszt Attilának segítőkész tanácsait, építő jellegű kritikáit, érveit-ellenérveit, melyek nem csak segítettek, irányították, hanem motiválták is a munkám.

Külön köszönet illeti intézetvezetőnket, Dr. Kondorosi Évát, aki a munkáimhoz szükséges feltételeket megteremtette és végig támogatásáról biztosított.

Szeretném köszönetemet kifejezni mindenkinek, aki segített, inspirált és támogatott a dolgozatom elkészítése során.

Köszönöm a disszertáció megírásával kapcsolatos hasznos tanácsokat és bírálatokat.

Végül, köszönöm családomnak a biztatást és a nyugodt, mindig támogató háttérrel, amit biztosítottak nekem.

A disszertációban tárgyalt kutatómunka az NKTH NSPEPBAC: TÉT_09-1-2010-0009 pályázat által finanszírozott.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alunni, B., Kevei, Z., Redondo-Nieto, M., Kondorosi, A., Mergaert, P. és Kondorosi, E. (2007). Genomic organization and evolutionary insights on *GRP* and *NCR* genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(9), 1138-1148.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D. és mtsai. (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J*, 34(4), 495-506.
- Arrighi, J. F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R. és mtsai. (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol*, 142(1), 265-279.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E. és Becker, A. (2008). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(11), 1498-1509.
- Barnett, M. J. és Fisher, R. F. (2006). Global gene expression in the *rhizobial*-legume symbiosis. *Symbiosis*, 42(1), 1-24.
- Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F. és mtsai. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), 9883-9888.
- Bauer, P., Crespi, M. D., Szecsi, J., Allison, L. A., Schultze, M., Ratet, P. és mtsai. (1994). Alfalfa *Enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol*, 105(2), 585-592.
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D. és mtsai. (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact*, 17(3), 292-303.
- Biswas, B., Chan, P. K. és Gresshoff, P. M. (2009). A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol Plant*, 2(3), 487-499.
- Boman, H. G. (1995). Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annual Review of Immunology*, 13, 61-92.
- Breukink, E. és de Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2), 223-234.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. és de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286(5448), 2361-2364.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S. és Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol*, 182(20), 5641-5652.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J. és mtsai. (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), 9877-9882.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E. P., Maillet, F. és mtsai. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, 12(9), 1647-1666.
- Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A. és mtsai. (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*, 18(16), 4476-4484.

- Charon, C., Sousa, C., Crespi, M. és Kondorosi, A. (1999). Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, *11*(10), 1953-1965.
- Chou, M. X., Wei, X. Y., Chen, D. S. és Zhou, J. C. (2006). Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization. *J Exp Bot*, *57*(11), 2673-2685.
- Cuiv, P. O., Keogh, D., Clarke, P. és O'Connell, M. (2008). The *hmuUV* genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Mol Microbiol*, *70*(5), 1261-1273.
- delaPena, T. C., Frugier, F., McKhann, H. I., Bauer, P., Brown, S., Kondorosi, A. és mtsai. (1997). A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant Journal*, *11*(3), 407-420.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J. F. és mtsai. (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, *20*(10), 2681-2695.
- Douglas, A. E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe*, *10*(4), 359-367.
- Dudley, M. E., Jacobs, T. W. és Long, S. R. (1987). Microscopic Studies of Cell Divisions Induced in Alfalfa Roots by *Rhizobium-Meliloti*. *Planta*, *171*(3), 289-301.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. és Kiss, G. B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, *417*(6892), 962-966.
- Ferguson, B. J. és Mathesius, U. (2003). Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *22*(1), 47-72.
- Ferguson, G. P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R. M., 2nd, Carlson, R. W. és Walker, G. C. (2004). Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(14), 5012-5017.
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F. J. és mtsai. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(17), 9889-9894.
- Fruhling, M., Hohnjec, N., Schroder, G., Kuster, H., Puhler, A. és Perlick, A. M. (2000). Genomic organization and expression properties of the *VfENOD5* gene from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*, *155*(2), 169-178.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F. és mtsai. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, *293*(5530), 668-672.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H. és Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet*, *42*, 413-441.
- Glazebrook, J. és Walker, G. C. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell*, *56*(4), 661-672.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B. W. és Oldroyd, G. E. (2006). Nodulation independent of *rhizobia* induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, *441*(7097), 1149-1152.
- Gualtieri, G. és Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol*, *42*(1), 181-194.
- Haag, A. F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A. és mtsai. (2011). Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol*, *9*(10), e1001169.
- Hantke, K. (2001). Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals*, *14*(3-4), 239-249.

- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P. és mtsai. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637.
- Hirsch, A. M. (1992). Developmental Biology of Legume Nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211-237.
- Hirsch, A. M. és Fang, Y. (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol Biol*, 26(1), 5-9.
- Jeon, J. M., Lee, H. I., Donati, A. J., So, J. S., Emerich, D. W. és Chang, W. S. (2011). Whole-genome expression profiling of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydrogen peroxide. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(12), 1472-1481.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. és Walker, G. C. (2007). How *rhizobial* symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
- Kaijalainen, S., Schroda, M. és Lindstrom, K. (2002). Cloning of nodule-specific cDNAs of *Galega orientalis*. *Physiol Plant*, 114(4), 588-593.
- Kevei, Z., Vinardell, J. M., Kiss, G. B., Kondorosi, A. és Kondorosi, E. (2002). Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago spp.* *Mol Plant Microbe Interact*, 15(9), 922-931.
- Kinkema, M. és Gresshoff, P. M. (2008). Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(10), 1337-1348.
- Kondorosi, E., Roudier, F. és Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol*, 3(6), 488-492.
- Kuster, H., Quandt, H. J., Broer, I., Perlick, A. M. és Puhler, A. (1995). The promoter of the *Vicia faba* L. VfENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin mediates a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* root nodules. *Plant Mol Biol*, 29(4), 759-772.
- Limpens, E. és Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, 6(4), 343-350.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. és Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302(5645), 630-633.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K. és mtsai. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of *rhizobial* signals. *Nature*, 425(6958), 637-640.
- Majchrzykiewicz, J. A., Kuipers, O. P. és Bijlsma, J. J. (2010). Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 440-451.
- Masson-Boivin, C. és Giraud, E. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? *Trends Microbiol*, 17(10), 458-466.
- Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P. és mtsai. (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One*, 5(3), e9519.
- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A. és mtsai. (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol*, 132(1), 161-173.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O. és mtsai. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), 5230-5235.

- Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. és Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science*, 315(5808), 101-104.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sonksen, C. P., Ludvigsen, S. és mtsai. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975-980.
- Nallu, S., Silverstein, K. A., Samac, D. A., Bucciarelli, B., Vance, C. P. és VandenBosch, K. A. (2013). Regulatory patterns of a large family of defensin-like genes expressed in nodules of *Medicago truncatula*. *PLoS One*, 8(4), e60355.
- Niehaus, K. és Becker, A. (1998). The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem*, 29, 73-116.
- Olah, B., Kiss, E., Gyorgypal, Z., Borzi, J., Cinege, G., Csanadi, G. és mtsai. (2001). Mutation in the ntrR gene, a member of the vap gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(7), 887-894.
- Oldroyd, G. E. és Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 519-546.
- Oldroyd, G. E., Engstrom, E. M. és Long, S. R. (2001). Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 13(8), 1835-1849.
- Oldroyd, G. E. és Long, S. R. (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *Plant Physiol*, 131(3), 1027-1032.
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S. és Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet*, 45, 119-144.
- Oono, R. és Denison, R. F. (2010). Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids. *Plant Physiol*, 154(3), 1541-1548.
- Op den Camp, R. H., Polone, E., Fedorova, E., Roelofs, W., Squartini, A., Op den Camp, H. J. és mtsai. (2012). Nonlegume *Parasponia andersonii* deploys a broad *rhizobium* host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Mol Plant Microbe Interact*, 25(7), 954-963.
- Penmetsa, R. V. és Cook, D. R. (1997). A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its *Rhizobial* Symbiont. *Science*, 275(5299), 527-530.
- Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J. P. és Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(12), 2103-2113.
- Perret, X., Staehelin, C. és Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1), 180-201.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U. és mtsai. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J*, 65(4), 622-633.
- Prayitno, J., Rolfe, B. G. és Mathesius, U. (2006). The Ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol*, 142(1), 168-180.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M. és mtsai. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585-592.
- Sandal, N., Krusell, L., Radutoiu, S., Olbryt, M., Pedrosa, A., Stracke, S. és mtsai. (2002). A genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* and strategies for fast mapping of new loci.
- Santos, R., Bocquet, S., Puppo, A. és Touati, D. (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 181(15), 4509-4516.

- Scheres, B., Vanengelen, F., Vanderknaap, E., Vandewiel, C., Vankammen, A. és Bisseling, T. (1990). Sequential Induction of Nodulin Gene-Expression in the Developing Pea Nodule. *Plant Cell*, 2(8), 687-700.
- Schroder, G., Fruhling, M., Puhler, A. és Perlick, A. M. (1997). The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol Biol*, 33(1), 113-123.
- Schultze, M. és Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet*, 32, 33-57.
- Smit, G., de Koster, C. C., Schripsema, J., Spaik, H. P., van Brussel, A. A. és Kijne, J. W. (1995). Uridine, a cell division factor in pea roots. *Plant Mol Biol*, 29(4), 869-873.
- Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S. és mtsai. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97(12), 3951-3959.
- Soupene, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. és Batut, J. (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3759-3763.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T. és mtsai. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417(6892), 959-962.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D. M., Bright, L., Oldroyd, G. és Harris, J. M. (2006a). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J*, 46(6), 961-970.
- Sun, J. H., Cardoza, V., Mitchell, D. M., Bright, L., Oldroyd, G. és Harris, J. M. (2006b). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal*, 46(6), 961-970.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K., Uchiumi, T. és mtsai. (2004). Control of nodule number by the phytohormone abscisic Acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol*, 45(7), 914-922.
- Tally, F. P., Zeckel, M., Wasilewski, M. M., Carini, C., Berman, C. L., Drusano, G. L. és mtsai. (1999). Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs*, 8(8), 1223-1238.
- Thomma, B. P., Cammue, B. P. és Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216(2), 193-202.
- Thomma, B. P. H. J. és Broekaert, W. F. (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(7), 533-537.
- Thoquet, P., Gherardi, M., Journet, E. P., Kereszt, A., Ane, J. M., Prosperi, J. M. és mtsai. (2002). The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol*, 2, 1.
- Timmers, A. C. (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and *rhizobia*. *J Microsc*, 231(2), 247-256.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L. H., Miwa, H. és mtsai. (2006). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, 441(7097), 1153-1156.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z. és mtsai. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, 327(5969), 1122-1126.
- Vance, C. P. és Gantt, J. S. (1992). Control of Nitrogen and Carbon Metabolism in Root-Nodules. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 266-274.

- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. és Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol*, 172(8), 4295-4306.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M. és Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am J Bot*, 91(11), 1846-1862.
- Yamanaka, K. (1999). Cold shock response in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1(2), 193-202.

MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

A pillangósvirágúak (Fabaceae/Leguminosae) család tagjainak különleges sajátossága, hogy endoszimbionta *Rhizobium* baktériumokkal (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*) képesek nitrogénkötő szimbiózist kialakítani, melynek során egy új növényi szerv, a gyökérgümő jön létre. A gümőben élő bakteroidok valójában átalakult *Rhizobium* baktériumok, melyek megváltozott anyagcsere aktivitása képessé teszi őket a légköri nitrogén hatékony megkötésére, ammoniává történő átalakítására, mely a partnernövény számára felvehető és hasznosítható tápanyagforrás.

Morfológiai és fejlődéstani szempontból kétféle fő gümő típust különböztetünk meg. Ezek a determinált és indeterminált gümők, melyek között a legszembevetőbb különbség a folyamatosan működő merisztéma hiánya, vagy annak megléte. Míg a determinált, nitrogénkötő gümők homogén szerkezetűek, addig az indeterminált típusú, érett gümő felépítése zónákra tagolható. Ezek a merisztematikus (I.) zóna, az infekciós (II.) zóna, az átmeneti (II-III.) zóna, a nitrogénkötő (III.) zóna és az öregedő vagy szeneszccens (IV.) zóna. A Galegoid klád tagjaiban, mint a lucerna, a borsó és a lóhere, az endoszimbionta baktériumok egy terminális differenciálódáson mennek keresztül, megtartva aktív anyagcseréjüket és a képességet a DNS szintézisére, ugyanakkor az egymást követő sejtosztódások elmaradása a DNS tartalom megnövekedését, 24 vagy annál is több kópia genomot eredményez (poliploidia). A megnövekedett sejttartalom mellett az alakjuk is jelentősen megváltozik, kialakítva a hosszúkás, néha Y alakban elágazó sejtformát. Átlagosan 5-10 µm hosszúak, vagyis ötször-tízszer hosszabbak az átalakult baktériumok a szabadon élő társaiknál. A folyamat során a bakteroid membránjának áteresztő képessége jelentősen megnő, melynek következtében több és többféle molekula számára válik átjárhatóvá. Azok a növényi faktorok, amelyek felelősek a baktériumok bakteroiddá történő átalakulásáért jelen vannak a Galegoid klád (*Cicer*, *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Glycyrrhiza*) tagjaiban, ugyanakkor hiányoznak a nem Galegoid klád növényeiből (*Lotus japonicus*).

Csoportunk a francia iker-intézettel (CNRS, Institut des Sciences du Végétal) együttműködve megállapította, hogy a gümő-specifikus cisztein gazdag peptidek (NCR), melyek a gümő transzkriptóma körülbelül 5%-át alkotják, azok a faktorok, melyek felelősek a bakteroid átalakulásért a Galegoid klád tagjainál.

A defenzinokkal mutatott hasonlóságok miatt megvizsgáltuk 14 különböző NCR molekula *ex planta* hatását CFU tesztben szabadonélő *S. meliloti 1021* baktériumon, melyek izoelektromos pontjuk alapján a peptidcsalád széles skáláját reprezentálták (pI 3,61-11,22). Kísérleteink megerősítették azt a feltételezést, hogy az NCR peptidek egy jól körülírható csoportja, a kationos tulajdonságú NCR molekulák antimikrobiális hatással rendelkeznek *in vitro*.

Az antimikrobiális hatás bizonyításához kiválasztottunk a csoportból kettőt, melyeket további vizsgálatoknak vetettünk alá. Az NCR247 és NCR335, két erősen kationos NCR peptid hatását CFU tesztben vizsgáltuk különböző Gram-pozitív (*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) és Gram-negatív (*Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*) baktériumokon. A vizsgált baktériumok többsége valamelyik kezelés hatására teljesen elpusztult. A CFU teszt alapján tehát mindkét alkalmazott peptid antimikrobiális (AMP) hatásának bizonyult *in vitro*.

Míg az AMP típusú molekulákról tudjuk, hogy főleg a membránon és a translációs apparátuson keresztül fejtik ki romboló hatásukat, addig az NCR peptidek hatásmechanizmusa ezidáig tisztázatlan maradt. A további kísérletekhez a szimbiotikus *Rhizobiális* partnert, az *S. meliloti 1021* baktériumot választottuk, hogy tanulmányozzuk az NCR peptidek antimikrobiális hatására bekövetkező génexpressziós változásokat. Az optimális kísérleti körülmények kiválasztásához megvizsgáltuk mindkét NCR molekula dózis-hatás függését és sejtölő aktivitását CFU tesztben két órás kezelésben 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml peptid alkalmazása mellett. Propídiium-jodid (PI) tesztben igazoltuk a növekvő peptid koncentrációk által az 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml-nél időfüggően bekövetkező (10 perc, 30 perc, 120 perc) membránáteresztő képesség növekedést. Az NCR247 és NCR335 peptidek 20 µg/ml és 50 µg/ml koncentrációknál kimagaslóan sejtölő hatásának bizonyultak. Ezekben a mintákban a két órás kezelést követően magas PI felvételt mértünk fluorométerrel, ami a sérült membrán áteresztőképességének növekedését és a nagyarányú sejtpusztulást jelezte. Még a 10 µg/ml-es peptid végkoncentráció is 90%-os sejtpusztulást eredményezett két órás kezelésben, azonban a kezelési idő csökkentése 10-, illetve 30 percre, jelentősen mérsékelte a peptidek antimikrobiális (AMP) hatását.

Az NCR247 és NCR335 peptidek által indukált génexpressziós változások vizsgálatához RNS szekvenálást terveztünk (SOLiD4 Life Technologies rendszert

alkalmazva) a peptideket termelő *M. truncatula* természetes körülmények között kölcsönható szimbiotikus partnerén, *S. meliloti* 1021 sejteken, olyan alacsony peptidkoncentrációt (10 µg/ml) és kezelési időtartamot választva (10 perc, 30 perc), melyeknél megfigyelhettük a baktérium sejtek korai válaszát, a sejtek jelentős pusztulása nélkül.

A peptid kezeléseket követően az *S. meliloti* 1021 genom mintegy 14%-a mutatott génexpressziós szinten a kétszeres határértéket meghaladó változást. Az NCR335 peptid hatására több gén expressziója változott jelentős mértékben (319 gén expressziója csökkent és 418 gén expressziója nőtt) mint az NCR247 esetén (153 gén expressziója csökkent és 242 gén expressziója nőtt). Az analízis rámutatott arra, hogy az NCR peptidek is hatnak a bakteriális membrán alkotóelemeire, megváltoztatva nagyszámú gén expresszióját. A lipid-komponenseket kódoló gének expressziós szintjének módosulása jelzi a baktérium átalakuló membránszerkezetét. Nagy számban változott a membrán transzport folyamatokhoz köthető gének működése, melyek a szükséges tápanyagok és ionok felvételét, valamint a toxikus komponensek sejtből történő kipumpálását végzik. A membránban található ABC transzportereket érintő változások több esetben kapcsolatosak az őket szabályozó vagy azokkal működési egységet alkotók változásával. Ezt figyelhettük meg például a cink és a vas felhasználás során említett gének esetén. A változások érintik a riboszóma biogenezist és a transzkripciós, translációs folyamatokat is. A nagyszámú riboszómális proteint kódoló gén (53) downregulált állapota a legmarkánsabb változás az analízis során. Ugyanez a csökkent működés figyelhető meg a szimbiotikus gümőből izolált bakteroidokban, sőt a legtöbb AMP típusú molekula által kiváltott hatás is hasonló folyamatokon alapul.

Ha a két peptid általános up- és downreguláló hatásait vizsgáljuk akkor az alábbi megállapításokat tehetjük. A csökkent expresszióval jellemezhető gének legnagyobb csoportja a genetikai információs folyamatok része. A transzkripciós folyamatokat érinti például az RNS-polimeráz alegységeket kódoló, a transzkripciós terminátor és az antiterminációs fehérjéket kódoló gének csökkent működése. A transláció iniciációs faktorok (IF-1,2,3), az elongációs faktorok (EF-G, EF-P, EF-Tu1, EF-Ts) és majdnem az összes riboszóma asszociált fehérjét kódoló gén és alegység, valamint a riboszóma biogenezishez kapcsolódó egyes gének expressziója szintén csökkent a kezelésekre hatására. Az RNS konformáció módosítást és az RNS molekulák érését végző proteinek, vagyis egyes ATP-függő RNS helikázok, ribonukleázok, polinukleotid foszforilázok expressziója ugyancsak csökkent. A foszfát-csoportok cseréjét katalizáló nukleotid-difoszfát kináz, szintén csökkent génaktivitást mutatott az NCR peptidekkel kezelt mintákban. A másik nagy csoport, melyben nagy számú gén

működése negatívan érintett, az oxidatív foszforiláció és a zsírsav bioszintézis. Ide tartoznak az ATP-szintetáz elemei, a citokróm bc_1 komplex és további hat gén, melyek a zsírsav bioszintézis enzimeit kódolják. Nagyszámú ABC transzporter, köztük a kadmium, spermidin/putrescin export elemek szintézise szintén gátlás alá kerültek a kezelések hatására.

A magasabb mRNS szintet mutató gének közül több a stressz-válaszhoz kapcsolható, így például markáns expressziós növekedés figyelhető meg a különböző hősokk fehérjéket kódoló gének között. A különböző ATP-függő proteázokat kódoló gének szintén indukálódtak. A transzkripciós regulátorok csoportjában mintegy 24 gén, a membrán transzport folyamatokhoz kapcsolódóan pedig 42 gén mRNS szintje nőtt meg a vizsgált NCR peptidkezelések hatására.

Az általános hatások mellett bizonyos gének megváltozott működése csak az egyik peptid hatására következett be, ezek a vizsgálati körülményeket figyelembe véve specifikusnak tekinthetők. Az NCR247 kezelés génaktivitás csökkenést eredményez az *lpxC* membrán komponens bioszintézisében, a hisztidin anyagcseréhez köthető *hisH* működésében és a protein szekréció *ffh* elemében. Specifikusan csökkenti az *SMc04329* konzervált ferredoxin-szerű hipotetikus fehérjét kódoló gén mRNS szintjét, ugyanakkor további 11 hipotetikus fehérjét továbbá a YedYZ szulfid-oxidáz alegységeket kódoló gének expresszióját serkenti. Az NCR247 upregulálja a membrán-transzport folyamatokat, például több ABC transzportert, így az *fbpC1*, *SMB20156*, *SMB21431*, *SMc03119*, *emrE*, *exbBD*, *rhrA*, *SMc02589*, *SMc02156*, *SMc00784*, *SMB21432*, valamint a protein lokalizációban és protein transzportban szereplő *exbB*, *exbD* és az *SMc01515* géneket.

Az NCR335 peptid specifikus upreguláló hatása érvényesül a lipid anyagcseréhez kapcsolódó *pccB*, *SMA0151*, *cfa2*, *SMc02636*, *tesA* elemeknél, valamint a citromsavciklus egyes tagjainál, így például a *sucACD* géneknél. Represszálja az RNS degradációhoz kapcsolódó *rhIE2*, *rne*, *rho* géneket és az oxidatív foszforiláció néhány elemét (*atpF*, *atpH*, *fbpC*, *fbpF*, *ppa*, *nuoK1*), egyes aminosav anyagcsere komponenseket (*aroQ*, *pyrBG*, *serB*, *SMB20821*, *dapA*), köztük a lizin bioszintézis néhány tagját (*lysA*, *dapA*, *thrA*). A nagyobb aktivitást mutató NCR335 peptid specifikusan csökkentette néhány hideg-sokk fehérjét kódoló gén működését (*csp1*, *csp4*, *cspA2*, *cspA8*).

A növényi eredetű NCR peptidek, melyek a bakteroidok terminális differenciálódását szabályozzák a szimbiotikus sejtekben, antimikrobiális *in vitro* aktivitása számos hasonlóságot mutat az AMP típusú molekulák által kiváltott hatásokhoz. Befolyással vannak a sejtmembrán összetételére és szerkezetére, gátolnak bizonyos transzkripciós elemeket és a

fehérje szintézist. A bakteriális sejtmembránon pórusokat képezve növelik annak átjárhatóságát, töltésükből adódóan pedig felboríthatják a membrán nyugalmi potenciálját. A szabadon élő *S. meliloti*-ban az NCR kezelések hatására megfigyelt gén expressziós változások több esetben a gümőből izolált bakteroidokban is tapasztalhatók. Ezek a változások érintik a jelátviteli eseményeket, a membránban zajló folyamatokat, az energia ellátást biztosító rendszert, a transzkripciós és transzlációs apparátust egyaránt. Az *in vitro* és *in planta* hatások között megfigyelt nagy számú különbség oka pedig, minden bizonnyal magyarázható a különböző NCR koncentrációkkal és/vagy a különböző peptid készletek jelenlétével a növényi sejtekben, és/vagy éppen a különböző környezeti/fiziológiai viszonyokkal.

Az *S. meliloti* 1021 transzkriptom analízist és a kísérleti eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy az NCR peptidek főbb hatásmechanizmusa a bakteriális membrán fizikai, kémiai és szerkezeti összetételének megváltoztatása, membránpotenciál megzavarása, ugyakkor intracelluláris célpontjai is lehetnek, melyek blokkolják a transzkripciós és transzlációs folyamatokat, és *in vivo* a baktériumok sejtosztódását a növényi sejtekben. Ezek korrekt bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel a jövőben.

ENGLISH SUMMARY

A special feature of Fabaceae/Leguminosae, commonly known as the legume plant family, is that they are able to form a nitrogen-fixing symbiotic relationship with endosymbiotic *Rhizobium* bacteria (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*), producing a new organ, the root nodule. Bacteroids that live inside the nodule are actually formed from Rhizobia, and their altered metabolic activity enables them to fix atmospheric nitrogen effectively and convert it into ammonia which is an absorbable and utilizable nutrient for the host plant.

Two main types of root nodules are described based on their morphology and development. These are determinate and indeterminate nodules, and the most obvious difference between them is the existence or absence of functional meristem. While the determinate, nitrogen-fixing nodules have a homogeneous structure, indeterminate mature nodules can be divided into zones. These are the meristematic zone (zone I), the infection zone (zone II), the interzone (II-III), the nitrogen-fixing zone (zone III) and finally the senescent zone (zone IV).

In members of the Galeoid clade, such as lucerne, pea and clover, endosymbionts go through a terminal differentiation, retaining active metabolism and the ability to amplify their genome, but at the same time the absence of consecutive cell divisions results in an increased DNA content, polyploidy, and 24 or more DNA copies. Beside increased cellular content, cell shape also changes significantly, creating an elongated cell form, sometimes branching in the Y shape. Their average length is 5-10 μ m, which means that differentiated bacteria are five-ten times longer than free-living ones. Throughout this process, the membrane permeability of the bacteria increases and consequently more molecules are able to transit through the membrane. The plant factors which are responsible for the differentiation of bacteria into bacteroids are present in members of the Galeoid clade (*Cicer*, *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Glycyrrhiza*), but they are absent in non-Galeoid clade, such as *Lotus japonicus* from the Robinoid clade.

Our research group, in cooperation with the French research team (CNRS, Institut des Sciences du Végétal) found that Nodule-specific Cysteine-Rich peptides (NCR) that

constitute about 5% of the nodule transcriptome are the factors responsible for the bacteroid formation in members of the Galeoid clade.

We examined the free living *S. meliloti* bacteria in CFU assay with 14 different NCR molecules (*ex planta*), which represented a wide range of the NCR peptide family based on their isoelectric point (pI 3.61 to 11.22). Summarising the results, the conclusion is clear that the well characterized group of the cationic NCR peptides have antimicrobial activity *in vitro*.

We selected two molecules from the group (NCR247 and NCR335) which were subjected to further analysis. The effect of the NCR molecules was tested on various pathogenic and non-pathogenic, Gram-positive (*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative (*Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*) bacteria and it was observed that a specific group of NCRs has antimicrobial properties.

It has already been established that AMP-type molecules mostly damage the membranes, but it has been yet unclear whether NCRs block similar processes as AMP or they acts in a different ways. For further studies we chose the *Rhizobial* symbiotic partner of *M. truncatula* to detect the mode of action and antimicrobial effects of NCR in the level in free living bacteria induced by the NCR peptides. For optimization of the conditions, we investigated the effect of each peptide dose-dependence and cell-killing activity on *Sm1021* in CFU assay after two-hour treatment by different peptide concentration (10 mg/ml, 20 ug/ml 50 ug/ml of peptide/2 hours of treatment). Propidium-iodide (PI) assays with increasing peptide concentrations (5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml peptides) showed time-dependent induction of membrane permeability (10 min, 30 min, 120 min),. The NCR335 and NCR247 peptides proved to be highly cytotoxic effect et 20 ug/ml and 50 ug/ml concentrations. In these samples high PI uptake was measured with a fluorometer after the two-hour treatment, which indicated some changes or damages in membrane permeability, or the cell death. NCRs, which resemble of antimicrobial peptides (AMPs) both in structure and in activity, displayed a significantly reduced killing effect when the treatment time was reduced (in 10- and 30-minute treatments).

To get an insight into the NCR provoked changes, global gene expression was studied by the RNA-Seq approach (SOLiD4 Life Technologies) in *S. meliloti* bacterial (natural partner of *M. truncatula*) cultures treated with sub-lethal amount of NCR247 or NCR335 peptides. In order to observe changes in gene expression, a peptide concentration of 10µg/ml

was chosen, and it was applied in two treatments so short (10 and 30 minutes) that the early response of the bacterial cell to the peptide's effect could be shown without significant cell death.

In total, differentially expressed genes at a twofold cut-off representing 14% of the predicted protein coding sequences in the *S. meliloti 1021* genome could be observed. NCR335 affected higher number of genes than NCR247 causing down- and up-regulation of 319 and 418 genes, respectively. In the case of NCR247 treatment, 153 genes were down- and 242 genes were up-regulated.

Many of the down-regulated genes functioning in genetic information processing: the expression of genes coding for proteins involved in transcription, such as the RNA-polymerase subunits (RpoABCZ), the transcription termination (Rho) and antitermination (NusG) proteins, as well as in translation, like translation initiation (IF-1,2,3) and elongation factors (*efG*, *efP*, *efTu1*, *efTu2*, *efTs*) and the ribosome-associated chaperone trigger factor (Tig), with genes coding for all the ribosomal subunits (Rps, Rpm and Rpl) and proteins predicted to be required for ribosome biogenesis (HflX, EngD) were down-regulated after peptide treatment. In addition, genes coding for proteins participating in conformational modification, metabolism or maturation of RNA molecules (ATP-dependent RNA helicases RhIE1, 2; ribonucleases E, P; polynucleotide phosphorylase/polyadenylase Pnp) also had decreased expression. Interestingly, genes coding for the RNA chaperone cold shock proteins Csp1, Csp4, CspA2, CspA8 are specifically down-regulated in the cells treated with the more active NCR335 peptide. The expression of genes coding for enzymes participating in the early, common steps of purine and thiamin biosynthesis also decreased. The transcription of the *ndk* gene encoding the nucleoside-diphosphate kinase catalyzing the exchange of phosphate groups between different nucleoside diphosphates was also inhibited in the peptide-treated samples. The other major biochemical functions that are down-regulated by the peptides are oxidative phosphorylation and fatty acid biosynthesis: all genes coding for the elements of the F₀F₁ ATP synthase and cytochrome bc₁ complex, as well as six genes coding for fatty acid biosynthetic enzymes showed decreased expression caused by the peptides. Certain ABC-transporter encoding genes including the ones implicated in heavy metal (cadmium) and spermidine/putrescine export were also inhibited.

Among the up-regulated genes we identified sequences coding for stress-related functions. The highest induction could be observed in the case of the *ibpA*, *rpoH1* and *msrA1* genes coding for a heat shock protein, an RNA polymerase sigma factor and a methionine sulfoxide

reductase A, respectively. The other two *msrA*, as well as the *clpB* and *hslV* genes encoding ATP-dependent proteases were also induced. The up-regulation of other heat shock protein (Hsp20s, GroES, GroEL, DnaJ, SMc01106) and protease (DegP3) encoding genes were less pronounced, their expression value crossed the threshold in the case of the treatment with the more effective NCR335 peptide. The largest groups of the induced genes encode proteins belonging to the functional categories of transcriptional regulation (24 genes) and membrane transport (42 genes). Interestingly, eight genes coding for transcriptional regulators were linked to peptide-induced operons/genomes determining the production of (ABC-type) membrane transporters. Probably, these transcription factors directly regulate the expression of these genes. We do not know the substrate for most of the up-regulated membrane transporters; however, the ZnuABC high-affinity zinc uptake (regulated by the induced Zur transcription factor) and part of the iron acquisition (FoxA-FhuFP-HmuSTUV proteins involved in ferroxamine transport) systems are the exemptions.

Summarizing our results, we can say that the NCR peptides, similarly to other AMP-type molecules, primarily change the bacterial membrane. Consequently, the pores and transmembrane components become more permeable, and at the same time changes in the gene expression level of lipid membrane components leads to an altered structure on the bacterial surface. NCRs affected transcription, translation inhibition. The most obvious evidence for this is the down-regulated state of a large number of genes that code for ribosomal proteins. However, this effect is very similar not only to the cellular response induced by some AMP molecules, but also to changes shown in bacteroids isolated from symbiotic nodules.

In addition to the general effects, there were some genes with altered expression, caused by one of the peptides only, which can be considered as a unique response to one of the NCRs. The NCR247 peptide specifically down-regulated the expression of the *lpxC* (membrane component), *hisH* (histidine metabolic pathways), *ffh* (protein secretion), SMc04329 gene coding for a conserved ferredoxin-like hypothetical protein. 11 genes upregulated coding for example the sulfite oxidase subunits YedYZ, the substrate-binding protein precursor of an iron uptake ABC transporter, as well as the ExbBD proteins that – in complex with TonB – transduce energy to TonB-dependent transporters facilitating mainly the uptake of iron complexes.

The NCR335 had peptide-specific effect related to the lipid metabolism (*pccB*, *SMa0151*, *cfa2*, *SMc02636*, *tesA*), as well as to the TCA cycle (*sucACD*). It repressed the

RNA degradation (*rhlE2*, RNE, *rho*) genes, some elements of the oxidative phosphorylation (*atpF*, *atpH*, *fbcB*, *fbcF*, *ppa*, *nuoK1*), components of the amino acid metabolic process (*aroQ*, *pyrBG*, SMb20821), including some members of the lysine biosynthetic pathway (*lysA*, *plysC*, *thrA*). NCR335 specifically down-regulated the expression of seven ORFs coding for hypothetical proteins, a gene coding for a fatty acid desaturase, the *mucR* gene and five genes coding for proteins involved in RNA metabolism such as the RNA chaperons Csp1, Csp4, CspA2, CspA8 and RNaseP.

Based on these observations, it seems that the AMP-like NCR peptides, that *in planta* govern the differentiation of bacteria, exert their antimicrobial activity *in vitro* by affecting bacterial cell membranes, probably via forming pores and destroying the membrane potential.

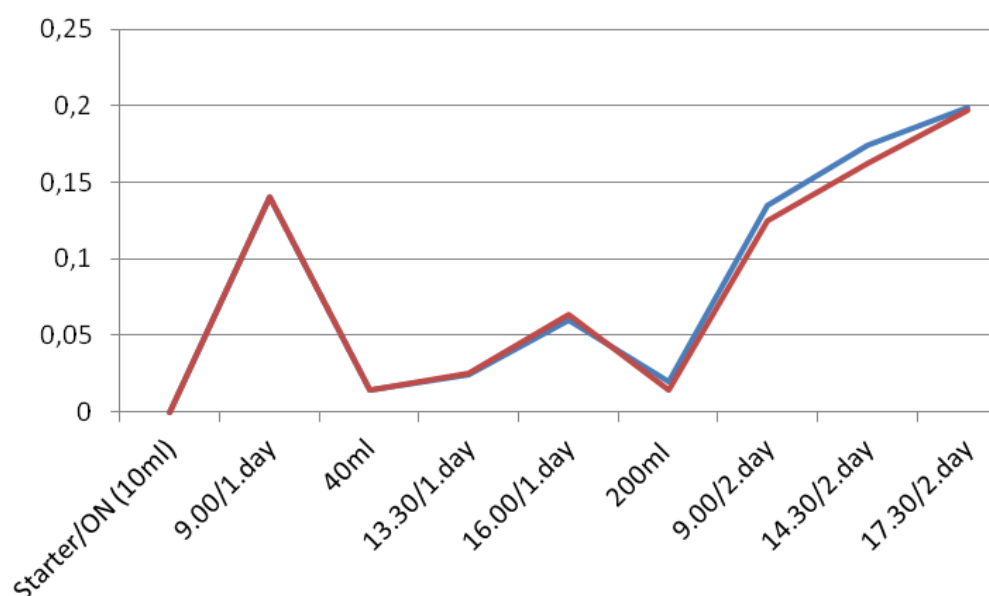
The gene expression changes observed in the free-living *S. meliloti* bacteria are most cases similar to the observation by the isolated bacteroids from the nodules. These changes affect the signaling events, the membrane processes and the energy system, as well as the transcriptional and translational apparatus.

On the basis of all these, the effects of peptides are less dramatic in the nodules than in our investigations. The observed differences between the *in vitro* and *in planta* effects might be the consequences of different concentrations of NCRs, and/or the presence of various sets of peptides in the plant cells, and/or the different environmental/physiological conditions. Based on our experimental result and transcriptome analysis of the *S. meliloti 1021* we can conclude that NCR peptides act via change in the bacterial membrane's physical, chemical and structural composition, and disrupt the membrane potential. The possibility can not be excluded that the might have intracellular targets blocking the transcription and translation processes, and also the bacterial cell division in plant nodules *in vivo*, but it needs further investigations.

FÜGGELÉKEK

| Összetevők neve | Összetevők mennyisége |
|---|--------------------------|
| K ₂ HPO ₄ | (5 mM), |
| MgSO ₄ | (100 μM), |
| FeCl ₃ | (10 μM), |
| CoCl ₂ | (0.2 μM), |
| CuSO ₄ | (0.2 μM), |
| Na ₂ MoO ₄ | (4 μM), |
| H ₃ BO ₃ | (1 μM), |
| KI | (0.2 μM), |
| ZnSO ₄ | (1 μM), |
| MnSO ₄ | (0.2 μM), |
| glucose | (20 g/l), |
| myo-inositol | (4 mg/l), |
| biotin | (0.4 mg/l), |
| thiamine-HCl | (2 mg/l), |
| pyridoxine-HCl | (0.4 mg/l). |
| NH ₄ (SO ₄) ₂ | 7 mM |
| yeast extract | 0.01% |

1A. függelék. A *Sinorhizobium meliloti* 1021 növesztéséhez használt tápoldat összetétele. Módosított Low-Salt Medium (LSM) (Liang és mtsai, 2001)



1B.függelék Az *Sinorhizobium meliloti* 1021 törzs növekedési görbéje LSM folyékony tápoldatban. A grafikon Y tengelye az optikai denzitást jelöli, az X tengely a mérési időpontokat.

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20029 | SMb20597 | SMb21509 | SMa1957 | SMc00562 | SMc02883 | SMc02351 | SMc03102 | SMc03949 |
| SMb20037 | SMb20633 | SMb21661 | SMa1990 | SMc00563 | SMc02886 | SMc02382 | SMc03137 | SMc04041 |
| SMb20117 | SMb20708 | SMb21669 | SMa2253 | SMc00653 | SMc01758 | SMc02386 | SMc03167 | SMc04164 |
| SMb20122 | SMb20755 | SMa0007 | SMa2273 | SMc00709 | SMc01759 | SMc02435 | SMc03169 | SMc04202 |
| SMb20215 | SMb20836 | SMa0151 | SMa2275 | SMc00823 | SMc01961 | SMc02521 | SMc03238 | SMc04406 |
| SMb20303 | SMb20906 | SMa0172 | SMa5007 | SMc00854 | SMc01983 | SMc02584 | SMc03260 | |
| SMb20331 | SMb20907 | SMa0214 | SMc00048 | SMc00876 | SMc01986 | SMc02591 | SMc03744 | |
| SMb20344 | SMb20951 | SMa0402 | SMc00117 | SMc00949 | SMc02047 | SMc02645 | SMc03769 | |
| SMb20345 | SMb20952 | SMa0471 | SMc00118 | SMc01006 | SMc02048 | SMc02646 | SMc03791 | |
| SMb20346 | SMb20989 | SMa1500 | SMc00144 | SMc01008 | SMc02049 | SMc02729 | SMc03795 | |
| SMb20471 | SMb21026 | SMa1677 | SMc00301 | SMc01021 | SMc02075 | SMc02731 | SMc03800 | |
| SMb20472 | SMb21127 | SMa1711 | SMc00302 | SMc01280 | SMc02122 | SMc02735 | SMc03807 | |
| SMb20495 | SMb21212 | SMa1783 | SMc00329 | SMc01522 | SMc02177 | SMc02775 | SMc03824 | |
| SMb20506 | SMb21379 | SMa1894 | SMc00397 | SMc01589 | SMc02278 | SMc02854 | SMc03825 | |
| SMb20593 | SMb21456 | SMa1896 | SMc00414 | SMc01600 | SMc02313 | SMc02858 | SMc03836 | |

2. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti* 1021 gének a 10 és 30 perces NCR335 kezelésekben up-regulálódtak (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20021 | SMb20586 | SMb21424 | SMc00864 | SMc00934 | SMc00956 | SMc01821 | SMc02857 |
| SMb20030 | SMb20660 | SMb21579 | SMc00913 | SMc00938 | SMc00958 | SMc01884 | SMc03058 |
| SMb20035 | SMb20679 | SMb21676 | SMa0890 | SMa2365 | SMc01007 | SMc01981 | SMc03136 |
| SMb20063 | SMb20684 | SMb21691 | SMa0981 | SMc00049 | SMc01102 | SMc02178 | SMc03166 |

| | | | | | | | |
|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20089 | SMb20701 | SMb22003 | SMa1052 | SMc00070 | SMc01136 | SMc02179 | SMc03170 |
| SMb20131 | SMb20752 | SMa0005 | SMa1057 | SMc00094 | SMc01140 | SMc02180 | SMc03258 |
| SMb20161 | SMb20756 | SMa0050 | SMa1525 | SMc00115 | SMc01160 | SMc02189 | SMc03262 |
| SMb20164 | SMb20766 | SMa0190 | SMa1533 | SMc00164 | SMc01175 | SMc02277 | SMc03788 |
| SMb20255 | SMb20865 | SMa0310 | SMa1641 | SMc00274 | SMc01240 | SMc02324 | SMc03802 |
| SMb20284 | SMb20963 | SMa0520 | SMa1765 | SMc00300 | SMc01267 | SMc02347 | SMc03813 |
| SMb20347 | SMb21006 | SMa0535 | SMa1840 | SMc00421 | SMc01417 | SMc02480 | SMc03835 |
| SMb20357 | SMb21267 | SMa0545 | SMa2014 | SMc00506 | SMc01498 | SMc02481 | SMc04150 |
| SMb20359 | SMb21288 | SMa0622 | SMa2065 | SMc00600 | SMc01628 | SMc02482 | SMc04153 |
| SMb20412 | SMb21329 | SMa0683 | SMa2251 | SMc00673 | SMc01819 | SMc02823 | SMc04201 |
| SMb20443 | SMb21353 | SMa0742 | SMa2317 | SMc00819 | SMc01820 | SMc02833 | SMc04259 |
| | | | | | | SMc04400 | SMc04395 |

3. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének a 10 perces NCR335 peptidkezelést követően up-regulálódtak (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20061 | SMb20422 | SMb21114 | SMa0424 | SMa1303 | SMc02776 | SMc03282 | SMc01856 | SMc03754 |
| SMb20078 | SMb20531 | SMb21183 | SMa0453 | SMa1456 | SMc03164 | SMc03293 | SMc01903 | SMc03889 |
| SMb20084 | SMb20647 | SMb21247 | SMa0476 | SMa1526 | SMa5012 | SMc00677 | SMc01943 | SMc04021 |
| SMb20153 | SMb20695 | SMb21338 | SMa0510 | SMa1568 | SMa5015 | SMc00857 | SMc01995 | SMc04039 |
| SMb20157 | SMb20696 | SMb21411 | SMa0537 | SMa1619 | SMa5017 | SMc01107 | SMc02033 | SMc04091 |
| SMb20163 | SMb20699 | SMb21413 | SMa0552 | SMa1644 | SMa5027 | SMc01143 | SMc02036 | SMc04137 |
| SMb20167 | SMb20702 | SMb21471 | SMa0633 | SMa1757 | SMc00103 | SMc01191 | SMc02242 | SMc04173 |
| SMb20195 | SMb20707 | SMb21474 | SMa0670 | SMa1820 | SMc00116 | SMc01460 | SMc02345 | SMc04241 |
| SMb20209 | SMb20753 | SMb21653 | SMa0687 | SMa1893 | SMc00178 | SMc01465 | SMc02346 | SMc04271 |
| SMb20212 | SMb20819 | SMb21680 | SMa0707 | SMa2000 | SMc00257 | SMc01553 | SMc02430 | SMc05011 |
| SMb20236 | SMb20868 | SMb22005 | SMa0728 | SMa2027 | SMc00258 | SMc01637 | SMc02440 | |
| SMb20277 | SMb21027 | SMb22024 | SMa0787 | SMa2151 | SMc00317 | SMc01649 | SMc02494 | |
| SMb20320 | SMb21032 | SMa0041 | SMa1017 | SMa2187 | SMc00478 | SMc01702 | SMc02650 | |
| SMb20397 | SMb21054 | SMa0189 | SMa1233 | SMa2311 | SMc00530 | SMc01765 | SMc02694 | |
| SMb20406 | SMb21068 | SMa0308 | SMa1245 | SMa2337 | SMc00596 | SMc01836 | SMc02734 | |

4. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének a 30 perces NCR335 peptidkezelés hatására up-regulálódtak (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20724 | SMc00058 | SMc00574 | SMc01468 | SMc02796 | SMc04094 |
| SMb20725 | SMc00187 | SMc00615 | SMc01569 | SMc02897 | SMc04185 |
| SMb20824 | SMc00188 | SMc00704 | SMc01700 | SMc02914 | SMc04234 |
| SMb20825 | SMc00193 | SMc00868 | SMc01781 | SMc03070 | SMc04262 |
| SMb20880 | SMc00294 | SMc00950 | SMc01784 | SMc03239 | SMc04278 |
| SMb20903 | SMc00357 | SMc01049 | SMc01924 | SMc03253 | SMc04317 |
| SMb21171 | SMc00362 | SMc01270 | SMc02058 | SMc03770 | SMc04318 |
| SMb21186 | SMc00475 | SMc01287 | SMc02310 | SMc03826 | SMc04319 |
| SMa0126 | SMc00488 | SMc01288 | SMc02408 | SMc03858 | SMc04320 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMA0128 | SMc00495 | SMc01322 | SMc02432 | SMc03859 | SMc04405 |
| SMA0130 | SMc00508 | SMc01327 | SMc02451 | SMc03881 | SMc04409 |
| SMA0132 | SMc00522 | SMc01336 | SMc02495 | SMc03986 | SMc04434 |
| SMA1243 | SMc00526 | SMc01344 | SMc02498 | SMc03990 | SMc04454 |
| SMA1623 | SMc00528 | SMc01369 | SMc02695 | SMc03994 | |
| SMc00005 | SMc00573 | SMc01428 | SMc02788 | SMc04003 | |

5. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének mindkét kezelési időt követően downregulálódtak az NCR335 peptid hatására (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | | |
|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMB20821 | SMA1087 | SMA1176 | SMc00152 | SMc00723 | SMc01360 | SMc02653 |
| SMB20876 | SMA1118 | SMA1179 | SMc00155 | SMc00724 | SMc01364 | SMc02685 |
| SMB20919 | SMA1126 | SMA1192 | SMc00192 | SMc00924 | SMc01494 | SMc02686 |
| SMB20996 | SMA1128 | SMA1201 | SMc00227 | SMc00945 | SMc01573 | SMc02693 |
| SMB21170 | SMA1131 | SMA1210 | SMc00231 | SMc01001 | SMc01581 | SMc03829 |
| SMB21175 | SMA1132 | SMA1211 | SMc00284 | SMc01024 | SMc01731 | SMc03860 |
| SMB21335 | SMA1136 | SMA1214 | SMc00293 | SMc01025 | SMc01782 | SMc03934 |
| SMB21416 | SMA1147 | SMA1216 | SMc00320 | SMc01048 | SMc01994 | SMc04261 |
| SMA0636 | SMA1149 | SMA1220 | SMc00534 | SMc01144 | SMc02053 | SMc04270 |
| SMA0667 | SMA1153 | SMA1266 | SMc00555 | SMc01206 | SMc02094 | SMc04314 |
| SMA0748 | SMA1154 | SMA1296 | SMc00570 | SMc01207 | SMc02112 | SMc04352 |
| SMA0765 | SMA1156 | SMc00020 | SMc00608 | SMc01209 | SMc02311 | SMc05006 |
| SMA0766 | SMA1158 | SMc00131 | SMc00643 | SMc01275 | SMc02404 | |
| SMA0767 | SMA1166 | SMc00149 | SMc00648 | SMc01333 | SMc02405 | |
| SMA1082 | SMA1169 | SMc00151 | SMc00657 | SMc01343 | SMc02434 | |

6. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének a 10 perces NCR335 peptidkezelés hatására downregulálódtak (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMB20904 | SMA1952 | SMc00787 | SMc00850 | SMc01338 | SMc01832 | SMc03792 |
| SMB21640 | SMc00146 | SMc00788 | SMc01167 | SMc01348 | SMc01906 | |
| SMA0123 | SMc00153 | SMc00791 | SMc01208 | SMc01427 | SMc01929 | |
| SMA0124 | SMc00255 | SMc00811 | SMc01218 | SMc01431 | SMc03228 | |
| SMA1657 | SMc00365 | SMc00812 | SMc01219 | SMc01771 | SMc03249 | |

7. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének a 30 perces, NCR335 peptid kezelés hatására downregulálódtak (specifikus NCR335 hatás).

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMB20039 | SMB21431 | SMA1623 | SMc01238 | SMc02616 | SMc03837 |
| SMB20047 | SMB21664 | SMA1945 | SMc01530 | SMc02699 | SMc03982 |
| SMB20124 | SMA0118 | SMA2071 | SMc01612 | SMc02726 | SMc04224 |
| SMB20156 | SMA0369 | SMA2281 | SMc01656 | SMc02732 | SMc04314 |
| SMB20363 | SMA0657 | SMA5021 | SMc01658 | SMc02839 | |
| SMB20402 | SMA0961 | SMc00248 | SMc01724 | SMc03002 | |

| | | | | |
|----------|---------|----------|----------|----------|
| SMb20704 | SMa1050 | SMc00692 | SMc01869 | SMc03119 |
| SMb20776 | SMa1056 | SMc00814 | SMc02238 | SMc03133 |
| SMb21086 | SMa1141 | SMc00849 | SMc02399 | SMc03288 |
| SMb21335 | SMa1394 | SMc01010 | SMc02577 | SMc03787 |

8. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének az NCR247 peptid hatására túlműködtek mind a 10 és 30 perces kezelési időtartamokban egyaránt (specifikus NCR247 hatás).

| | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20025 | SMb21171 | SMa2329 | SMc00817 | SMc03154 |
| SMb20056 | SMb21702 | SMa2331 | SMc00977 | SMc03196 |
| SMb20296 | SMa0150 | SMa2333 | SMc01000 | SMc03880 |
| SMb20399 | SMa1077 | SMa2393 | SMc01496 | SMc04023 |
| SMb20462 | SMa1078 | SMa2402 | SMc01594 | SMc04396 |
| SMb20716 | SMa1079 | SMc00041 | SMc01722 | |
| SMb20728 | SMa1081 | SMc00045 | SMc02150 | |
| SMb20862 | SMa1927 | SMc00264 | SMc02259 | |
| SMb20914 | SMa2117 | SMc00539 | SMc02366 | |
| SMb20999 | SMa2235 | SMc00601 | SMc02367 | |

9. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének az NCR247 peptid specifikus hatására up-regulálódtak a 10 perces kezelési időtartamokhoz köthetően.

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20103 | SMa2412 | SMc00784 | SMc01516 | SMc02156 | SMc03845 |
| SMb20458 | SMc00195 | SMc01281 | SMc01517 | SMc02187 | SMc05008 |
| SMb21432 | SMc00400 | SMc01282 | SMc01523 | SMc02202 | |
| SMb21516 | SMc00402 | SMc01514 | SMc02084 | SMc02365 | |
| SMa1171 | SMc00611 | SMc01515 | SMc02085 | SMc02589 | |

10. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének a 30 perces NCR247 kezelésre up-regulálódtak (NCR 247 specifikus hatás)

| | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20019 | SMb20020 | SMb20940 | SMb21517 | SMb21518 | SMc03746 | SMc04329 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|

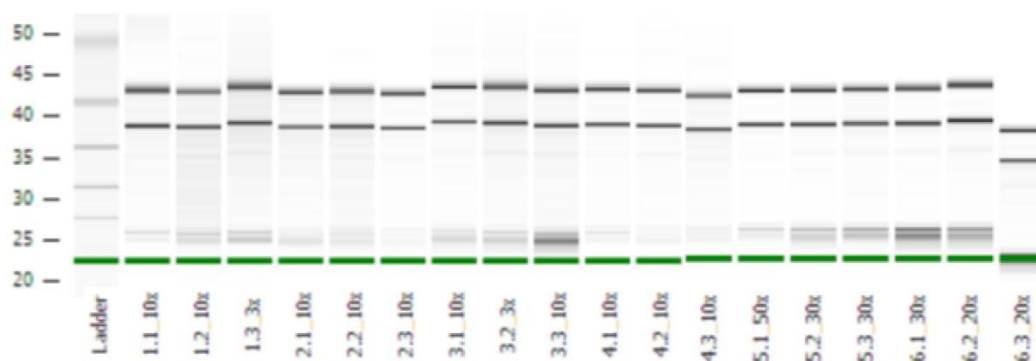
11. függelék A táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének az NCR247 peptidre alulműködtek 10 és 30 perces kezelési időtartamokhoz köthetően (NCR247specifikus hatás).

| | | | | | | |
|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| SMb20090 | SMa0657 | SMa1848 | SMa5019 | SMc01054 | SMc02123 | SMc03857 |
| SMb20415 | SMa1279 | SMa1951 | SMc00029 | SMc01194 | SMc02124 | SMc04016 |
| SMb21173 | SMa1610 | SMa2019 | SMc00521 | SMc01325 | SMc02399 | SMc05014 |
| SMb21671 | SMa1612 | SMa5008 | SMc00703 | SMc01842 | SMc02564 | |
| SMa0380 | SMa1637 | SMa5009 | SMc00908 | SMc01875 | SMc02839 | |

12. függelék Az általunk alkalmazott körülményeknél, a táblázatban szereplő *S. meliloti 1021* gének az NCR247 peptidre alulműködtek a 10 perces kezelési időtartamokhoz köthetően (NCR247specifikus hatás).

| | | | |
|----------|----------|----------|----------|
| SMb20170 | SMb21285 | SMa1636 | SMc02572 |
| SMb20340 | SMb21711 | SMc00661 | SMc02845 |
| SMb21083 | SMa0461 | SMc00953 | SMc03026 |
| SMb21248 | SMa0922 | SMc01985 | SMc04038 |

13. függelék A táblázatban szereplő néhány *S. meliloti 1021* gén az NCR247 peptid hatására downregulálódott a 30 perces kezelési időtartamokhoz köthetően (NCR247specifikus hatás).



14. függelék. A transzkriptóm szekvenáláshoz tisztított RNS minták minőségi meghatározása és mennyiségi mérése (Agilent 2100 Bioanalyzer)

| Gén | rpsF | rpsD | rplM | ibpA | ndvA | pnp | rpsA |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| NCR247/1_10' | 0,29 | 0,30 | 0,57 | 2,66 | 7,50 | 0,74 | 0,57 |
| NCR247/2_10' | 0,22 | 0,25 | 0,48 | 2,45 | 7,34 | 0,62 | 0,17 |
| NCR247/3_10' | 0,20 | 0,26 | 0,21 | 2,94 | 8,26 | 0,73 | 0,23 |
| qRT-PCR átlag | 0,21 | 0,27 | 0,42 | 2,68 | 7,70 | 0,70 | 0,32 |
| Szórás | 0,05 | 0,03 | 0,19 | 0,25 | 0,49 | 0,07 | 0,22 |
| Szekv. adat | 0,37 | 0,35 | 0,46 | 2,06 | 3,08 | 0,51 | 0,43 |

| Gén | rpsF | rpsD | rplM | ibpA | ndvA | pnp | rpsA |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| NCR335/1_10' | 0,03 | 0,07 | 0,11 | 2,40 | 1,37 | 0,19 | 0,11 |
| NCR335/2_10' | 0,03 | 0,04 | 0,09 | 4,07 | 2,20 | 0,17 | 0,07 |
| NCR335/3_10' | 0,03 | 0,05 | 1,39 | 2,36 | 2,04 | 0,12 | 0,10 |
| qRT-PCR átlag | 0,03 | 0,05 | 0,53 | 2,94 | 2,12 | 0,16 | 0,09 |
| Szórás | 0,00 | 0,02 | 0,74 | 0,98 | 0,11 | 0,04 | 0,02 |
| Szekv. adat | 0,21 | 0,16 | 0,41 | 3,88 | 2,69 | 0,28 | 0,26 |

| Gén | rpsF | rpsD | rplM | ibpA | ndvA | pnp | rpsA |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| NCR247/1_30' | 0,33 | 0,35 | 0,58 | 4,53 | 7,73 | 0,61 | 0,59 |
| NCR247/2_30' | 0,20 | 0,18 | 0,23 | 5,46 | 5,62 | 0,29 | 0,12 |
| NCR247/3_30' | 0,13 | 0,16 | 0,21 | 5,21 | 3,97 | 0,22 | 0,13 |
| qRT-PCR átlag | 0,22 | 0,23 | 0,34 | 5,07 | 5,77 | 0,37 | 0,28 |
| Szórás | 0,10 | 0,10 | 0,21 | 0,48 | 1,88 | 0,21 | 0,27 |
| Szekv. adat | 0,41 | 0,45 | 0,46 | 3,45 | 2,54 | 0,35 | 0,33 |

| Gén | rpsF | rpsD | rplM | ibpA | ndvA | pnp | rpsA |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| NCR335/1_30' | 0,04 | 0,03 | 0,09 | 5,13 | 1,16 | 0,07 | 0,05 |
| NCR335/2_30' | 0,03 | 0,03 | 0,06 | 4,17 | 1,39 | 0,04 | 0,03 |
| NCR335/3_30' | 0,04 | 0,04 | 0,10 | 5,70 | 1,88 | 0,07 | 0,05 |
| qRT-PCR átlag | 0,04 | 0,03 | 0,08 | 5,00 | 1,48 | 0,06 | 0,04 |
| Szórás | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,77 | 0,37 | 0,02 | 0,01 |
| Szekv. adat | 0,29 | 0,22 | 0,34 | 5,46 | 2,20 | 0,24 | 0,23 |

15. függelék A qRT-PCR alapján számolt expressziós értékek. A táblázat tartalmazza az egyes biológiai minták qRT-PCR alapján számolt expressziós adatait, a három biológiai párhuzamos átlagát a szórás mértékével, valamint összehasonlításként a szekvenálás adott génre vonatkozó adatait.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK**Közlemények referált, lektorált folyóiratokban**

1. **Hilda Tircz**, Attila Szűcs, Attila Farkas, Bernadett Pap, Rui M. Lima, Gergely Maróti, Éva Kondorosi, Attila Kereszt (2013). Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* (2013)
2. Zoltán Kevei, Mikhail Baloban, Olivier Da Ines, **Hilda Tircz**, Alexandra Kroll, Krzysztof Regulski, Peter Mergaert, Eva Kondorosi (2011): Conserved CDC20 Cell Cycle Functions Are Carried out by Two of the Five Isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6(6) 2011
3. Willem Van de Velde, Grigor Zehirov, Agnes Szatmari, Monika Debreczeny, Hironobu Ishihara, Zoltan Kevei, Attila Farkas, Kata Mikulass, Andrea Nagy, **Hilda Tircz**, Beatrice Satiat-Jeunemaître, Benoit Alunni, Mickael Bourge, Ken-ichi Kucho, Mikiko Abe, Attila Kereszt, Gergely Maroti, Toshiki Uchiumi, Eva Kondorosi, and Peter Mergaert (2010): Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Science* 26 Feb 2010; 327: 1122-1126.
4. **Hilda Tircz** (2008): Map based cloning of leaf developmental abnormality in *Medicago sativa* and comparison of the rDNA (NOR) regions in *Medicago truncatula* and *Medicago sativa*. (Dissertation Summaries) *Acta Biologica Szegediensis* Volume 52, Number 2 (2008).
5. G. Telegdy, **H. Tircz**, A. Adamik (2005): Involvement of neurotransmitters in urocortin-induced passive avoidance learning in mice. *Brain Research Bulletin* 67 (2005) 242–247

6. Bíró Borbála, **Tiricz Hilda**, Morvai Balázs (2001): Investigations on the vitality, resistance and diversity of metal-adapted and non-adapted *Rhizobium* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 48: 167-157.

Könyvfejezetek

1. Matics Heléna, **Tiricz Hilda**, Horváth Nikoletta, Bíró Borbála (2013): Érzékeny és toleráns *rhizobiumok* szaporodása növekvő toxikus elem dózisok függvényében. Fiatal kutatók az egészséges élelmiszerért. DE tudományos képzési műhelyeinek támogatása TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024. ISBN 978-963-473-601-1 Szerk: Bódi Éva, Fekete István, Kovács Béla, Debrecen, 141-146 pp. 2013.02.19. Tudományos közlemények
2. Endre G, Kiss E, Borbola A, **Tiricz H**, Lozsa A, Olah B, Kuppusamy K, Sharopova N, VandenBosch KA (2007) The *Medicago truncatula* Lin Mutant: caught by map-based cloning characterised by transcriptomics. In: ED Dakora FD, Chiphango SBM, Valentine AJ, Elmerich C, Newton WE (ed.) Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture: Joint Conference of the 15th International Congress on Nitrogen fixation/12 International Conference of the African-Association-for-Biological Nitrogen-Fixation JAN 21-26, 2007 Cape Town, South Africa. Berlin, New York: SPRINGER, 2008. pp.225-226.(Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture; 42.) Chapter in Book/scientific

Előadások

1. **Tiricz Hilda** (2008). *Medicago truncatula* „sticky leaf” mutáció térképezésén alapuló klónozása, valamint az rDNS (NOR) régiók összehasonlítása *Medicago truncatula*ban és *Medicago sativaban*. (Előadás) Szegedi Biológia Doktorandusz Konferencia 2008

2. Bíró Borbála, **Tiricz Hilda**, Morvai Balázs (2000): Nehézfém-adaptált és normál *Rhizobium* törzsek szaporodási képessége, vitalitása és faji diverzitása közötti összefüggések vizsgálata. *Az MMT és a Szlovén Mikrobiológiai Társaság 2000. Évi Naggyűlésének Előadaskivonatai*, p. 12.

Egyéb publikációk

1. **H. Tiricz**, A. Szűcs, A. Farkas, P. Mergaert, E. Kondorosi, A. Kereszt (2012): *In vitro* approaches to identify rhizobial pathways targeted by nodule-specific cystein-rich peptides (Poster) 10th European Nitrogen Fixation Conference Munich, German 02.-05.09.2012, PP 10-13
2. Eva Kondorosi, Peter Maergert, G. Maróti, A. Farkas, **H. Tiricz**, M. Baloban, A. Szűcs, K. Mikuláss, É. Klement, H. Győri-Dürgő, E. Ábrahám, A. Kereszt (2012) Domestication of the endosymbiotic *Rhizobium* partner by *Medicago truncatula* (Előadás) 10th European Nitrogen Fixation Conference Munich, German 02.-05.09.2012, OP 10-1
3. Boglarka Olah, Sandor Jenei, Ernő Kiss, Andrea Borbola, Marianna Nagymihály, **Hilda Tiricz**, Rui Maria Lima, Attila Kereszt, Beatrix Horvath, Agota Domonkos, Pascal Ratet, Gabriella Endre, Peter Kalo (2012): Exploiting the European *Medicago truncatula* Tnt1 insertional mutant collection (Poster) 10th European Nitrogen Fixation Conference Munich, German 02.-05.09.2012, PP 9-16
4. Emese Petra Balogh, Tímea Mosolygó, **Hilda Tiricz**, Adrienn Karai, Fanni Kerekes, D. Virók, Katalin Burián, Éva Kondorosi (2011): Anti-Chlamydial effect of plant peptides (Poster:PPP-1) 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Magyar Mikrobiológiai Társaság nemzetközi kongresszusa

5. **H. Tircz**, L. Ördögh, Z. Kevei, K. Mikuláss, P. Mergaert, A. Kereszt, E. Kondorosi (2010): Next Generation Sequencing based transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* treated by *Medicago truncatula* nodule specific cystein rich peptides. (Poster) 9th European Nitrogen Fixation Conference September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland
6. L. Ördögh, **H. Tircz**, Z. Kevei, A. Farkas K. Mikuláss, G. Maróti, P. Mergaert, E. Kondorosi, A. Kereszt (2010): Transcriptome analysis of *Medicago truncatula* symbiotic root nodules and nodule-specific cysteine-rich peptides treated *Sinorhizobium meliloti*. (Poster) 9th European Nitrogen Fixation Conference September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland
7. Gergely Maróti, Attila Farkas, Dulguun Dorjgotov, Andrea Nagy, Kata Mikulass, **Hilda Tircz**, Zoltan Kevei, Lilla Ördögh, Attila Kereszt, Éva Kondorosi (2010): Nodule specific *Medicago* peptides exhibit strong antibacterial activity (Poster) AMP, Split, 8 - 13 August 2010
8. Peter Mergaert, Willem Van de Velde, Grigor Zehirov, Hironobu Ishihara, Agnes Szatmari, Katalin Mikulass, Monika Debreczeny, Attila Farkas, Andrea Nagy, **Hilda Tircz**, Gergely Maroti, Attila Kereszt, Toshiki Uchiumi, Eva Kondorosi (2010): Antimicrobial peptides mediate bacteroid differentiation in *Medicago truncatula* nodules. (Előadás) 9th European Nitrogen Fixation Conference September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland
9. Willem Van de Velde, Grigor Zehirov, Agnes Szatmari, Monika Debreczeny, Hironobu Ishihara, Attila Farkas, Kata Mikulass, Andrea Nagy, **Hilda Tircz**, Beatrice Satiat-Jeunemaître, Benoit Alunni, Mickael Bourge, Ken-ichi Kucho, Mikiko Abe, Shiro Higashi, Attila Kereszt, Gergely Maroti, Toshiki Uchiumi, Eva Kondorosi, Peter Mergaert (2010): Innate immunity in legume-*rhizobium* symbiosis; antibiotic peptides and terminal differentiation of microsymbiont (Poster) The 19th Annual Meeting of Japanese Society of Plant Microbe Interactions

10. Kata Mikuláss, Attila Farkas, **Hilda Tiricz**, Andrea Nagy, Dulguun Dorjgotov, Gergely Maróti, Mónika Debreczeny, Zoltán Kevei, Viktor Szegedi, Attila Kereszt, Willem Van de Velde, Peter Mergaert, Éva Kondorosi (2009): Novel source of antimicrobial peptides from leguminous plants (Poster) 2009 Junius 17-19 Saint-Malo FRANCE, Second International Symposium on Antimicrobial Peptides

11. G. Endre, E. Kiss, A. Borbola, **H. Tiricz**, A. Lozsa, B. Olah, K. Kuppusamy, N. Sharopova, K. A. VandenBosch (2008): The *Medicago truncatula lin* Mutant: Caught by Map-Based Cloning, Characterised by Transcriptomics. (Abstract) Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Volume 42, II, Part 8, 225-226, DOI: 10.1007/978-1-4020-8252-8_83

12. Ernő Kiss, Éva Ádám, **Hilda Tiricz**, Barna Bors, Veronika Szabó, Andrea Keszthelyi, Attila Kereszt, Ferenc Nagy, Gabriella Endre (2008): Comparative expression analysis of *Medicago* symbiotic genes (Előadás) Straub napok