

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Botanika Program

A növény-specifikus *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) géncsalád evolúciós és funkcionális jellemzése

PhD értekezés

Szalontai Bálint

Témavezető:

Dr. Jakab Gábor

PhD

PÉCS, 2012.

BEVEZETÉS

A patogenezishez köthető (PR) fehérjék a növényi rezisztencia válaszok fontos effektor molekulái. Általánosan elterjedtek a növényvilágban, jelenleg tizenhét ún. PR családba sorolják őket biológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján. Mindezidáig egyetlen PR családot sem azonosítottak, amely lipáz, vagy lipáz-szerű enzimeket tartalmazna, noha számos kutatás igazolta, hogy a lipázok, ill. lipid eredetű szignálok fontos szerepet töltenek be különböző növényi stresszválaszokban.

A lipázok az észterázokhoz hasonlóan az alfa/béta hidroláz enzimek csoportjába tartoznak és preferenciálisan hosszú szénláncú lipid molekulákat hidrolizálnak glicerinné és szabad zsírsavakká, míg az észterázok elsősorban rövid szénláncú lipideket hidrolizálnak. Mínt hogy a jázmonsav (JA) növényi stresszhormon is lipid származék, már korán felismerték a lipid molekulák jelentőségét a JA szignál utat aktiváló sebzési válaszokban. Évekkel később kimutatták, hogy dohány növényekben a szalicilsav (SA) mediálta szisztémás szerzett rezisztenciában (SAR) is jelentős a lipid alapú jelátvitel a SABP2 proteinen keresztül, amelynek SA gátolta észteráz aktivitása van. Lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) növényekben homológ funkciót töltenek be az AtMES proteinek, melyeket ugyancsak észterázokként azonosítottak. Emellett még számos, kevésbé jellemzett lipáz enzimet is leírtak, melyek szintén kapcsolatba hozhatók növényi stresszválaszokkal. Ezek főleg két csoportból kerülnek ki, a GDSL lipázok, illetve a 3-as típusú lipázok csoportjából.

A GDSL lipázok (más nevezéktan szerint SGNH lipázok) különösen érdekesek a növényi rezisztencia folyamatok szempontjából. Ide tartozik a GLIP1 enzim, amely erősen indukálódik az etilén (ET) analóg etefon kezelés hatására és fontos szerepet játszik az *Arabidopsis* növények *Alternaria brassicicola* elleni védekezésében, mint jelátviteli komponens és mint direkt antimikrobiális aktivitással rendelkező fehérje egyaránt. Később azt is felismerték, hogy a GLIP1 túltermelő lúdfű növények megemelkedett rezisztenciát mutatnak *Alternaria* fertőzéssel szemben, és egy GLIP1-ET szignálút lehetőségét is felvetették, mely a SAR-tól függetlenül működhet. Az *Arabidopsis* GLIP fehérjék egy másik tagja a GLIP2, amelyet mRNS szinten a SA, a metil jazmonát (MeJA) kezelések és az etefon egyaránt indukáltak, szintén befolyásolja a növényi rezisztencia válaszokat az auxin szignálút gátlása révén. Érdekes, hogy itt a génexpressziót ilyen antagonisztikus hatású kémiai kezelések egyaránt fokozták. A CaGLIP1 ugyancsak egy GDSL

lipáz, amelyet paprikából izoláltak, és amelynek expressziója kifejezett szövet specifitást mutat. Olyan transzgenikus lúdfű növényekben, amelyekben mesterségesen csendesítették a *CaGLIP1* gént a *Xanthomonas campestris* fertőzés tünetei jelentősen csökkentek, a baktériumok növekedése pedig korlátozott volt a kontroll növényekhez képest. Ezzel szemben a gén túltermeltetése növelte az Arabidopsis növények fogékonyságát a kórokozóra. Egy másik paprikából izolált GDSL lipáz erősen indukálódott MeJA kezelés hatására és sebzés hatására is, és valószínű, hogy fontos szerepe lehet a CaPR4 expresszió szabályozásában. A Br-Si1 szintén egy lipáz enzim, amelyet kínai kel levelekben és szárukban azonosítottak elsőként és erős indukciót mutat a SA analóg benzotiadiazol (BTH) kezelés esetén csakúgy, mint a *Pseudomonas syringae* bakteriális fertőzés hatására, a JA vagy az ET hormonok hatására viszont nem. A GER1 nevű GDSL lipázt rizs növényekben azonosították és megállapították, hogy a JA stresszhormon, valamint a vörös/távoli vörös hullámhossz tartományba eső fénysugárzás egyaránt indukálja a kifejeződését. Jóval többet tudunk a másik lipáz csoport, a 3-as típusú lipázok funkciójáról.

Ezek közé az ún. 3-as típusú lipáz doménnel rendelkező alfa/béta hidrolázok közé tartozik három fehérje, amelyeknek alapvető szerepe van az Arabidopsis növények biotikus stresszválaszaiban. Ezek a PAD4, az EDS1 és a SAG101 fehérjék, amelyek a patogén támadások elleni elsődleges védelmi rendszert alkotják Arabidopsisban. Számos kísérlet vizsgálta a 3-as típusú lipázok biológiai szerepeit, mégis keveset tudni a fehérjék *in vivo* szubsztrátjairól, illetve lipolitikus aktivitásáról. Tulajdonképpen az sem biztos, hogy ténylegesen rendelkeznek-e ilyen biokémiai aktivitással. Az általunk vizsgált PRLIP fehérjék szintén a 3-as típusú lipázok közé tartoznak. Kilenc gént azonosítottak a lúdfű genomában, amelyek PRLIP fehérjéket kódolnak, három génnek – *PRLIP3*, *PRLIP8*, *PRLIP9* – a rizs genomában is megtalálták az ortológjait. Kimutatták, hogy a *PRLIP1*, a *PRLIP2* és a *PRLIP6* gének erősen indukálódnak biotikus stresszhatásokra. A rekombináns PRLIP1 fehérje ezen kívül *in vitro* körülmények között észteráz aktivitást is mutatott.

CÉLKITŰZÉSEK

I. *In silico* vizsgálataink során:

1. Összehasonlítani a PRLIP aminosav szekvenciákat a lúdfű genomból prediktált lipolitikus enzimek széles csoportjával, hogy feltérképezzük a hasonló biokémiai funkciót betöltő enzimek közötti strukturális hasonlóságokat.
2. Filogenetikai elemzések segítségével rekonstruálni a géncsalád molekuláris evolúcióját magasabb rendű növényekben, hogy megtudjuk, az Arabidopsis *PRLIP* gének ortológjai előfordulnak-e más fajokban is.
3. Átvizsgálni microarray adatbázisokat, hogy újabb adatokat nyerjünk a különböző Arabidopsis *PRLIP* gének stresszhatásokra bekövetkező expressziós változásairól.

II. Kísérletes munkánk során:

1. Megvizsgálni az eddig részletesen nem jellemzett Arabidopsis *PRLIP* géneket (*PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9*), különös tekintettel a stresszhormon kezelésekre hatására megjelenő, illetve a szerv specifikus expressziós különbségekre, hogy megtudjuk hasonlóan reagálnak-e ezekre a hatásokra, mint a géncsalád többi paralóg tagja.
2. Megvizsgálni a szőlő *PRLIP* génjeinek kórokozó támadás hatására bekövetkező expressziós válaszait Pinot Noir és Cabernet Sauvignon szőlőfajtákban, hogy megtudjuk vajon mutatnak-e hasonló, intenzív stresszválaszokat egy másik növényfaj ortológ génjei is.
3. Összehasonlítani antagonistá hatású stresszinduktor kezelésekre hatását a szőlő *PRLIP* génjeinek expressziójára Pinot Noir szőlőnövények leveleiben, hogy megismerjük melyik növényi szignálutakhoz köthető a gének szabályozása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az *in silico* génexpressziós vizsgálatok, az adatbázis elemzés és a filogenetikai analízis

A microarray adatok az NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) adatbázisból származnak. Az *Arabidopsis* proteóm 3-as típusú lipáz enzimjeit InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) keresés segítségével azonosítottuk. Az általunk vizsgált 25 növényfaj genom információja a Phytozome v7.0 adatbázisban található (<http://www.phytozome.net>). A szekvenciákat a JalView számítógépes programmal illesztettük a ClustalW, illetve a MUSCLE metódusok segítségével. A filogenetikai vizsgálatokat a PAUP* 4.0 szoftverrel végeztük. A távolság alapú módszerek közül a szomszéd összevonó algoritmust alkalmaztuk (Neighbour Joining), a Bootstrap tesztek 1000 ismétlésben végeztük.

A növénynevelés és a kémiai kezelések

Vizsgálatainkhoz a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) Columbia ökotípusát alkalmaztuk. A magokat földkeverékben csíráztattuk, majd 1 hetes korban tűzdeltek tőzegkockákba. A Pinot Noir és Cabernet Sauvignon szőlő fajtákat a PTE Szőlészeti és Borászati Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A kísérleti növényeket vernalizált szőlővesszőkből hajtottuk, amelyeket perlitben neveltünk tovább. A kémiai kezelésekhez nátrium-szalicilát, benzotiadiazol (BTH), jázmonsav (JA) és NaCl vizes oldatait alkalmaztuk permetezéses vagy beöntözéses módszerrel. Az etilén (ET) kezeléseket zárt térben végeztük. A lisztharmattal (*Erysiphe necator*) fertőzött szőlőleveleket szabadföldi kultúrából gyűjtöttük és a fertőzöttség mértéke szerint csoportosítottuk.

A DNS/RNS izolálás, reverz transzkripció és a kvantitatív PCR

A genomi DNS mintákat DNeasy Mini Kit segítségével izoláltuk. A totál RNS mintákat folyékony nitrogénben fagyasztott és porított növényi szövetekből vontuk ki. DNáz I kezelést követően az RNS minták minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, koncentrációjukat NanoDrop ND-1000 készülékkel mértük meg. A cDNS mintákat 4 µg (*Arabidopsis*), ill. 200 ng (szőlő) RNS mintákból szintetizáltuk First Strand cDNA Synthesis Kit segítségével oligodT(18) primer felhasználásával.

A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatokat (qPCR) a Step One™ Real-Time PCR System segítségével végeztük. A relatív géneexpressziós változásokat a Step One™ 2.0 számítógépes programmal számoltuk a $\Delta\Delta CT$ módszerrel. Belső kontrollnak az *Ubiquitin2* gént választottuk szakirodalmi adatok alapján az Arabidopsis minták esetében, szőlő géneexpressziós méréseknél pedig az *Elongációs faktor 2 alfa* gént alkalmaztuk. Az amplifikáció 20 μ l térfogatban történt, amelybe összemértünk 10 μ l ROX tartalmú Maxima™ SybrGreen 2 x Mix-et, 0,6 μ l-t mindkét 10 pmol/ μ l koncentrációjú primerből, 8,5 μ l vizet és 2 μ l-t a hígított cDNS mintákból, a következő PCR program szerint: 10 min elődenaturáció 95°C-on, amelyet 45 cikluson keresztül 15 s denaturáció követett 95°C-on, 30s tapadás 60°C-on, 30s elongáció 72°C-on. A mérések során 3 technikai replikátumot alkalmaztunk mintánként, az amplitonokat pedig olvadási görbe felvételével ellenőriztük.

A PCR fragmentek klónozása és szekvenálása

A klónozandó PCR termékeket DreamTaq™ DNS polimeráz segítségével állítottuk elő 23 μ l térfogatú reakciókban amelynek összetétele: 2,3 μ l 10 x DreamTaq™ puffer; 0,5 mM dNTP mix; 1-1 μ M az egyes primerekből; 4 μ l gDNS, illetve cDNS minta; 1,25 U enzim és 12,5 μ l víz. A PCR termékeket 0,5 x TBE tartalmú 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, a fragmenteket a GeneJet Gel Extraction Kit segítségével izoláltuk. A fragmenteket a pJET1.2 plazmid vektorba a CloneJET PCR Cloning Kit segítségével klónoztuk. A transzformáláshoz *Escherichia coli* DH5 alpha kompetens sejteket használtunk. A transzformálást a pJET1.2 forward és pJET1.2 reverse primerek segítségével ellenőriztük kolónia PCR segítségével. A DNS szekvenálást a PTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézetében végeztük Big Dye Cycle Sequencing Kit felhasználásával ABI PRISM 3100 Genetic Analyser készülék segítségével.

EREDMÉNYEK

A PRLIP proteinek egy önálló csoportot alkotnak az Arabidopsis 3-as típusú lipázok között

Kilenc *PRLIP* gént azonosítottak Arabidopsis növényekben, amelyek mindegyike tartalmaz egy 3-as típusú lipáz domént. Egy korábbi átfogó szekvencia vizsgálat során összevetettük a szekvenciáikat 116 Arabidopsisból származó lipáz, észteráz illetve foszfolipáz enzim szekvenciával. Ez igazolta a csoport monofiletikus eredetét. Filogenetikai vizsgálataink

kimutatták azt is, hogy a PRLIP fehérjék nem homológjai más, 3-as típusú lipázoknak így a növényi védelemhez köthető EDS1-nek vagy a PAD4-nek sem. A PRLIP csoport monofiletikus eredetét a gének jellegzetes exon-intron szerkezete is alátámasztja.

Az Arabidopsis PRLIP gének expressziós különbségei

A *PRLIP* gének (különös tekintettel az eddig még nem jellemzett *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génekre) expressziós változásait elsőként microarray adatok segítségével próbáltuk vizsgálni. Sajnos az adatok között elég sok bizonytalanságot és ellentmondást fedeztünk fel. Ezt részben okozhatja a gén annotációk pontatlansága, de a nagyfokú szekvencia-szintű hasonlóság is. Végül a kísérletes megközelítést részesítettük előnyben, amelynek során kvantitatív valós idejű PCR technikát alkalmaztunk. Ennek során különböző kémiai ágensekkel kezeltük a szabályozott körülmények között tartott kísérleti növényeket majd mértük azok génexpressziós válaszait. Méréseink alapján a *PRLIP3*, a *PRLIP9* és a *PRLIP8* gének mindegyike egy relatíve magas transzkripciót mutatott minden általunk vizsgált szövetben. Ezen belül a *PRLIP3* gén esetében gyökerekben, a *PRLIP9* esetén termésekben, a *PRLIP8* esetében pedig szárakban mértük a legmagasabb expressziót. További fontos különbség, hogy ezen gének inkább állandó expressziót mutattak és jóval kevésbé reagáltak stresszhatásokra, szemben a géncsalád többi tagjával (elsősorban a *PRLIP1*, *PRLIP2* és *PRLIP6* gének).

Az Arabidopsis thaliana és az A. lyrata PRLIP génklaszterének összehasonlítása

A *PRLIP* géncsaládot elsőként lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modell növényben jellemezték. Azóta meghatározták egy közel rokon faj, az *Arabidopsis lyrata* teljes genom szekvenciáját is. Ez jó lehetőséget kínált, hogy a két faj *PRLIP* génjeit összehasonlítva, információkat kapjunk a géncsalád molekuláris evolúciójáról. A *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének mindkét fajban megtalálhatóak voltak, elszórtan, különböző kromoszómákon és különböző genomi régiókban lokalizálódtak. Ezzel szemben a család többi tagja (amelyek erőteljes stresszválaszokat mutattak) mindkét fajban egy-egy génklaszterben csoportosult. A legtöbb *PRLIP* gén azonos pozícióban és azonos orientációban fordul elő mindkét homológ genomi régióban. Azonban jelentős különbségek is megfigyelhetők. A *PRLIP2* gén például teljes egészében hiányzik az *A. lyrata* genomból. További különbség az *A. lyrata PRLIP1* és *PRLIP4* génje között megtalálható kis kódoló régió (mely egy feltételezett GTP kötő fehérjét kódol), amely azonban hiányzik az

A. thaliana *PRLIP* klaszteréből. További különbség a fajok között a *PRLIP4* gén kópiáinak száma, amelyekből kettővel több található meg az *A. lyrata*-ban, mint az *A. thaliana*-ban.

A növényi PRLIP fehérjék általános és genom specifikus csoportokra oszthatók

Ahogy a két taxonómiai közeli rokon *Arabidopsis* faj esetében megfigyeltük, mindössze 5 millió évnyi független evolúció is elég volt ahhoz, hogy jelentős különbségek alakuljanak ki a *PRLIP* génklaszterek között. Szerettük volna, magasabb taxonómiai szinteken is rekonstruálni a géncsalád evolúcióját, ezért átvizsgáltuk a jelenleg hozzáférhető 25 növényi genomot a Phytozome adatbázisban és összegyűjtöttük a *PRLIP* fehérjék homológjait. Összesen 135 *PRLIP* homológ protein szekvenciát azonosítottunk 23 növényfajból. A két zöldalga faj esetében nem tudtunk egyértelmű *PRLIP* ortológokat azonosítani. A filogenetikai vizsgálathoz a *Physcomitrella* lombosmoha három *PRLIP* fehérjéjét alkalmaztuk kulcscsoportként, a belcsoportot pedig a Tracheofita növények szekvenciái alkották. A *Selaginella* szekvenciák jelentkeztek alapi helyzetben a törzsfán, a zárvatermők szekvenciái pedig két nagy kládot alkottak. Mindkét nagy klád esetében a terminális ágon különféle zárvatermő növények *PRLIP* fehérjéjét találtuk: az első ilyen csoportba került az *Arabidopsis* *PRLIP8* szekvencia, míg a másodikba a *PRLIP3* és a *PRLIP9* szekvenciák. Megállapítottuk tehát, hogy ezeknek az ősi proteineknek az ortológjai minden megszekvenált zárvatermő genomban megtalálhatóak, így „általános” *PRLIP* fehérjéknek neveztük őket. Érdekes jelenség, hogy a pázsitfűvek genomjaiban általában négy paralóg *PRLIP8* szekvencia és két *PRLIP3/9* szekvencia figyelhető meg. A törzsfá többi ágára szinte kizárólag egy-egy adott növényfajra specifikus szekvenciákból álló *PRLIP* csoportok kerültek. Összesen kilenc ilyen klád különíthető el a filogenetikai fán. Az általános *PRLIP* génekkel szemben ezeknek a fehérjéknek génjei általában egy génklaszterben kódoltak az *Arabidopsis* *PRLIP* klaszterekhez hasonlóan, tehát a géncsalád első jellemzése során vizsgált *PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5*, *PRLIP6* és *PRLIP7* gének által kódolt fehérjék valójában egy ilyen egyedi, az *Arabidopsis thaliana*-ra specifikus szekvencia csoportot alkotnak.

Az általános és a specifikus PRLIP gének szülő növényekben is eltérő módon expresszálódnak

Ahogy a génexpressziós vizsgálataink rámutattak, lúdfűben a *PRLIP* gének különbözőféleképpen nyilvánulnak meg, attól függően, hogy az általános, vagy a specifikus csoportba tartoznak-e.

Hogy kiderítsük ez a jelenség mennyire általános a növényvilágban, összehasonlítottuk vizsgált *Arabidopsis PRLIP* géneket egy távolabbi rokon faj ortológ génjeivel, különösen a stresszfolyamatokhoz köthető génexpressziós változások tekintetében. A vizsgálatainkat a szőlő (*Vitis vinifera*) modell növényen végeztük. Összességében a *Vitis* genomban egy-egy kópia található az általános *PRLIP* génekből, amelyeket *VvPRLIP8* és *VvPRLIP3/9*-nek neveztünk. A 16. kromoszómán található továbbá egy specifikus, *VvPRLIP* géneket tartalmazó génklaszter is. Összesen hét lókuszt találtunk ebben a génklaszterben, amelyek DNS szinten erős homológiát mutattak más növények *PRLIP* génjeivel. Ezeket *VvPRLIPE*, *VvPRLIPA*, *VvPRLIPF*, *VvPRLIPC*, *VvPRLIPG*, *VvPRLIPD* és *VvPRLIPB* nevekkal jelöltük. Ezek közül a *VvPRLIPG* biztosan csak egy gén fragment. A *VvPRLIPC* és *VvPRLIPF* gének esetében az exon-intron határok manuális revíziója sokat segített a tényleges aminosav szekvencia meghatározásában.

Kérdéses volt azonban, hogy a prediktált *PRLIP* gének közül melyek transzkriptálódnak ténylegesen, és jelennek meg mRNS szinten is. Ennek vizsgálatára terveztünk egy univerzális primert (*VvUNIV*) amelynek segítségével képesek voltunk amplifikálni bármely *PRLIP* homológ régiót a hét közül. A kapott PCR fragmenteket klónoztuk, majd szekvenáltuk, így megbizonyosodtunk róla, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között, az általunk vizsgált mintákban, a hét potenciális specifikus *PRLIP* homológ régióból csak kettő – *VvPRLIPA* és a *VvPRLIPC* – transzkriptálódik. A vizsgálatunkat különböző szervekből származó, illetve fertőzött és fertőzetlen levélmintákon is elvégeztük. Megjegyzendő azonban, hogy a többi *VvPRLIP* paralóg gén is expresszálódhat bizonyos általunk nem vizsgált szövetekben vagy speciális körülmények között, illetve a *VvPRLIPA* és *VvPRLIPC* templátok erős kompetíciója is okozhatta, hogy nem sikerült a többi specifikus *VvPRLIP* gént transzkripció szinten ezzel a módszerrel detektálnunk.

A szövet, ill. szerv specifikus expresszió számos patogén indukálta növényi gén fontos ismérve. Megvizsgáltuk a *VvPRLIP* gének transzkripció különbségeit kezeletlen szőlő növények különböző szerveiben. Az általános *PRLIP* gének közül mind a *VvPRLIP8*, mind a *VvPRLIP3/9* gének viszonylag egyenletes transzkripció szintet mutattak a vizsgált szövetekben, a legnagyobb mért különbség is mindössze 2,5-szeres érték volt. Ezzel szemben a specifikus szőlő *PRLIP* gének sokkal kifejezettebb különbségeket mutattak az alapexpressziós értékeikben, mintegy 160-szoros különbséget is detektáltunk például a *VvPRLIPA* gén esetében a levelek és a virágok között.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a szőlő *PRLIP* géncsalád tagjai mennyire köthetők különböző stresszfolyamatokhoz, ezért megmértük a szőlő *PRLIP* gének expressziós változásait különféle stresszhatásoknak kitett szőlőlevelekben. Elsőként a Pinot Noir és a Cabernet Sauvignon szőlő fajták lisztharmattal (*Erysiphe necator*) fertőzött leveleit dolgoztuk fel. Megfigyeltük, hogy a specifikus *VvPRLIP* gének expressziója mindkét szőlő fajtában markánsan emelkedett a fertőzés hatására. A gyenge fertőzés 26-szoros (a Pinot Noir fajta esetében), illetve 80-szoros (a Cabernet Sauvignon fajta esetében) emelkedést okozott a *VvPRLIPA* gén mRNS szintjében, míg a *VvPRLIPC* ennél is magasabb, 125- illetve 500-szoros indukciót mutatott az egyes fajtákban. Az általános *PRLIP* gének megnyilvánulásában viszont jóval gyengébb különbségeket figyeltünk meg, amelyek szinte elhanyagolhatóak a specifikus *PRLIP* gének expressziójában bekövetkezett erőteljes emelkedéshez viszonyítva.

A megfigyelt jelenségeket laboratóriumi körülmények között hajtattott szőlővesszőkön is megvizsgáltuk, amelyeket különböző rezisztencia folyamatokat indukáló kémiai ágensekkel kezeltünk. Ezeket a vizsgálatokat a Pinot Noir szőlőfajtán végeztük, mert ennek a fajtának ismert és nyilvános a teljes genom szekvenciája. Minthogy a lisztharmatfertőzés szőlőben a SA szignálutat indukálja, a kísérleti növényeken az útvonal mesterséges induktort, a BTH kezelést alkalmaztuk. A fertőzéshez hasonlóan ebben az esetben is megfigyelhető mindkét specifikus *VvPRLIP* gén indukciója, míg az általános *PRLIP* géneknél csak gyenge, vagy nem szignifikáns fluktuációkat figyelhettünk meg az mRNS szintekben. A kísérleti növényekben ET kezeléssel indukáltunk a SA jelátviteli útvonallal antagonisztikus rezisztencia utat is az ET/JA szignálutat. Az ET az összes szőlő *PRLIP* gén expressziós szintjét csökkentette, de a specifikus *PRLIP* gének bizonyultak rá a legérzékenyebbeknek.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A növényi *PRLIP* géncsalád az indukálható, védelemhez köthető gének egy kevésbé jellemzett csoportja. Eredményeink megerősítették, hogy a *PRLIP* gének több tulajdonságukban hasonlítanak a tipikus PR fehérjéket kódoló génekhez.

Az első ilyen tulajdonság, hogy a géncsalád tagjai nagy változatosságot mutatnak transzkripciós indukálhatóság tekintetében. Ahogy láttuk a *PRLIP* család mindkét vizsgált növényfajban két csoportra osztható. Az egyik a növény-mikroba kölcsönhatáshoz köthető tagok

csoportja, amelyet filogenetikai vizsgálataink alapján specifikus csoportnak nevezünk. A másik az általános *PRLIP* gének csoportja, amelyek nem kötődnek szorosabban ezekhez a folyamatokhoz. A specifikus *PRLIP*ek erősen indukálódhatnak biotikus stresszhatásokra, ahogy azt mindkét vizsgált növényfaj esetében kimutattuk. Érdekes jelenség, hogy a *PRLIP1* gén megnyilvánulását ellentétes hatású szignál útvonalak egyaránt serkentik, amely jelenség a rizs *PR-1* géncsaládjában is megfigyelhető, különösen az *OsPR1a* gén esetében. A PR gének általában erőteljes szövet specifikitást, illetve fejlődéshez kötött regulációt is mutatnak egészséges növényekben. Ezt a jelenséget is sikerült kimutatnunk, mind az *Arabidopsis*, mind a szőlő *PRLIP* gének esetében.

A második hasonlóság a *PRLIP* géncsalád és más *PR* családok között a gének elrendeződése. Kimutattuk, hogy a specifikus *PRLIP* gének az általunk vizsgált növényfajok többségében génklaszterekbe rendeződnek. Hasonló jelenséget írtak le a germin-szerű fehérjék esetében árpa növényekben, vagy a szőlő *PR-1* gének esetében is. Tandem duplikációval kialakult *PR-1* gének csoportjait lúdfű és rizs növényekben is kimutatták.

A harmadik érdekes közös tulajdonság a *PRLIP* gének és más *PR* családok génjei között az egy-egy adott növénycsoportban kialakult, specifikus paralóg csoportok jelenléte. Rizs, illetve egyszikű növényekre nézve specifikus, génklaszterekben kódolt 3-as típusú peroxidázokat már korábban is nagy számban írtak le, de az *Arabidopsis* genomban is azonosítottak taxon-specifikus endoglükánázokat. A lipid transzfer fehérjék esetében is megfigyelhetők különböző növényi fejlődési vonalakban egymástól függetlenül megjelent paralóg csoportok. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az ugyancsak függetlenül kialakult egyedi *PRLIP* paralógok a patogének elleni növényi védelemben vesznek részt. Hasonló *PR* csoportok ugyancsak véletlenszerűen alakultak ki a törzsfejlődés során, mint például a Bowman-Birk típusú proteínáz inhibitorok, amelyeket csak a *Poaceae* ill. *Fabaceae* családokból írtak le eddig.

Eredményeink alapján tehát a *PRLIP* géncsalád az indukálható védelemhez köthető fehérjék egy új csoportja lehet, amely erős hasonlóságot mutat más *PR* családokkal főleg a patogén támadásokhoz kötött expressziós válaszok és a szerv specifikus alapexpresszió tekintetében. Eredményeink hozzájárulnak a gének funkciójának pontosabb megértéséhez és a további fehérje szintű vizsgálatokhoz is értékes információt szolgáltatnak.

PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Szalontai B, Jakab G (2010) Differential expression of *PRLIPs*, a pathogenesis-related gene family encoding class 3 lipase-like proteins in *Arabidopsis*. *Acta Biol Hung* 61(suppl):176-191 (IF: 0.793)

Szalontai B, Stranczinger Sz, Palvalfi G, Mauch-Mani B, Jakab G (2012) The taxon specific paralogs of grapevine *PRLIP* genes are highly induced upon powdery mildew infection. *J Plant Phys in press* (doi.: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.010>) (2011. IF: 2.791)

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és poszterek

Kovacs S, Szalontai B, Jakab G (2008) Functional characterisation of the *PRLIP* gene family in *Arabidopsis*. A Magyar Növénybiológiai Társaság IX. Kongresszusa, Szeged. Poszter absztrakt.

Szalontai B, Kis-Bicskei N, Nagy A, Jakab G (2009) Comparative genetic analysis reveals an expansive evolution of the *PRLIP* gene family in *Brassicaceae*. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, Nyíregyháza. Poszter absztrakt.

Szalontai B (2009) A *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) géncsalád adaptív evolúciója a növényvilágban. Genetikai Műhelyek Magyarországon VIII. Minikonferencia, Szeged. Előadás.

Szalontai B (2009) A *PRLIP* géncsalád evolúciója a növényvilágban. Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs. Előadás.

Jakab G, Szalontai B, Kovacs S (2009) Szignálutak a növényi stresszválaszok primingjában. 80 éves a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszéke – Botanikai minikonferencia, Debrecen. Előadás.

Jakab G, Szalontai B, Kovacs S, Nagy A (2011) A növény-specifikus *PRLIP* gének összehasonlító funkcionális jellemzése. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok. Előadás.

Szalontai B, Jakab G (2011) A *PRLIP* gének összehasonlító jellemzése és molekuláris evolúciója a növényvilágban. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok. Poszter absztrakt.

Szalontai B, Jakab G (2011) Adaptive evolution of the *PRLIP* gene family resulted taxon-specific defense-related paralog groups in different plant species. PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Joint meeting of the "PR-proteins Workshop" and the "Working Group Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases" of the International Organisation of Biological Control (IOBC/wprs), Neuchâtel, Svájc. Előadás.

Szalontai B, Stranczinger Sz, Palfalvi G, Mauch-Mani B, Jakab G (2012) Grapevine *PRLIP* genes that are highly inducible by powdery mildew infection form a taxon-specific paralog group. Plant Biology Congress (jointly organized by FESPB and EPSO), Freiburg, Németország. Poszter absztrakt.

Egyéb tudományos közlemények

Pal R, Pinke Gy, Szalontai B (2006) Belvizes szántók növényzete Belső-Somogyban. Somogyi Múzeumok Közleményei 17:41-56

Kocsis M, Szalontai B, Farkas A, Stranczinger Sz (2008) Molecular study of energy grass cultivar 'Szarvasi-1' and its genetic relationship to Hungarian *Elymus* species and populations based on RAPD analysis. Acta Bot Hung 50(1-2):115-124

Csiky J, Mesterhazy A, Szalontai B, Potone OE (2010) A morphological study of *Ceratophyllum tanaiticum*, a species new to the flora of Hungary. Preslia 82(2):247–259 (IF: 2.792)

Czegledi L, Tamas A, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Szalontai B, Szabadfi K, Javor A, Reglodi D, Helyes Zs (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. Gen Comp Endocrinol 172(1):115-119 (IF: 3.267)

Csete S, Stranczinger Sz, Szalontai B, Farkas A, Pal RW, Salamon-Albert E, Kocsis M, Tovari P, Vojtela T, Dezso J, Walcz I, Janowszky Zs, Janowszky J, Borhidi A (2011) Tall wheatgrass cultivar Szarvasi-1 (*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* cv. Szarvasi-1) as a potential energy crop for semi arid lands of Eastern Europe. In: Majid Nayeripour, Mostafa Keshti (editor) Sustainable Growth and Applications in Renewable Energy Sources. (pp:269-294) Rijeka – InTech. Könyvfejezet.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo Gy Jr, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. Cell Tissue Res 348(1):37-46 (2011. IF: 3.114)

Egyéb konferencia előadások és poszterek

Szalontai B, Kocsis M, Stranczinger Sz (2007) A 'Szarvasi-1' energiafű taxonómiai és összehasonlító genetikai jellemzése RAPD markerekkel. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred. Poszter absztrakt.

Szalontai B (2007) Hazai *Agropyron* és *Elymus* taxonok jellemzése molekuláris markerekkel XVIII. OTDK Biológia Szekció, Debrecen, Hungary. Előadás.

Nagy A, Kovacs S, Szalontai B, Jakab G (2009) Regulation of ABA1 gene expression in *Arabidopsis thaliana* VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, Nyíregyháza. Poszter absztrakt.

Reglodi D, Tamas A, Czeglédi L, Szalontai B, Borzsei R, Bagoly T, Csanaky K, Banki E, Kiss P, Horvath G, Szauer E, Nemeth J, Mark L, Brubel R, Helyes Zs (2010) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the milk of domestic animals and humans. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs. Poszter absztrakt.

Mesterhazy A, Potone Olah E, Szalontai B, Csiky J (2010) Morphology and habitat preference of *Ceratophyllum tanaiticum* Sapjegin in Hungary. I(VII) International Conference on Aquatic Macrophytes „Hydrobotany 2010”, Borok, Oroszország. Poszter absztrakt.

Szivak I, Bengerno-Vadkerti E, Szalontai B, Kučinić M, Vučković I, Pauls US, Balint M (2011) Climate change and evolution in springs: radiation, speciation and hybridization of autumn caddisflies on the western Balkan. 7th Symposium for European Freshwater Sciences, Girona, Spanyolország. Poszter absztrakt.

Szivak I, Pauls US, Kučinić M, Vučković I, Szalontai B, Vadkerti E, Mikes T, Balint M (2012) Adaptive radiation of *Chaetopteryx rugulosa* group (Trichoptera) induced by climate and geology in the Western Balkans. International Symposium "Evolution of Balkan Biodiversity", Zagreb, Horvátország. Előadás.

Szivak I, Pauls US, Kučinić M, Vučković I, Szalontai B, Vadkerti E, Mikes T, Balint M (2012) Klímaváltozás és evolúció forrásokban: őszi tegzesek (*Chaetopteryx rugulosa* fajcsoport) radiációja, specializációja és hibridizációja. 29. Magyar Ökológus Kongresszus, Keszthely. Poszter absztrakt.

Az összes publikáció kumulatív impaktfaktora (2011): 12,757

Összes citációk száma: 6, (ebből 3 független)

H-index: 2