

Zárójelentés

Dr. Gárdonyi Márk: A búzaszem textúráját meghatározó fehérjék tanulmányozása *in vitro* rendszerekben.

OTKA nyilvántartási szám: **D 048401**

Bevezetés

Az endospermium textúrája igen fontos tényező a búzaszem jellemzése szempontjából, mivel jelentős mértékben meghatározza a belőle készült liszt, ill. tézsa felhasználhatóságát. A búzaminták adott végtermék előállítása szempontjából lényeges tulajdonságai és az endospermium szerkezete közötti viszony, egyike a gabonatudomány első, több mint száz éve leírt összefüggéseinek. A szemkeménység napjainkban is olyan alapvető jellemzője a búzának, mely meghatározza kereskedelmi értékét, így rendkívül fontos tulajdonság a nemesítők számára is. A búza keménysége a gabonaszem deformációval szembeni ellenállásának a mérőszáma.

A malomipar számára a búza keménysége befolyásolja az őrlés során felhasznált energia mennyiségét, így a szemkeménységnek közvetlen költségvonzata van. Az endospermium szerkezete meghatározza a búza kondicionálásakor alkalmazandó paramétereket, a liszt részecske-méretét, sűrűségét, a keményítő-sérülés mértékét és ezen keresztül a liszt vízfelvevő képességét, és mindezek mellett a lisztkihozatal mértékét is.

A búzanemesítők egyre több és nagyobb kihívással kell, hogy szembenézzenek. Olyan fajtákat kell létrehozni, melyek kielégítik a növekvő felhasználói igényeket (malomipar, sütőipar, fogyasztó), melyek akár sajátos igényű végtermékek előállítására is alkalmasak. A búza szemkeménysége egyik igen fontos jellemzője a búzának, mely sok egyéb feldolgozási, felhasználási technológiai paramétert is meghatároz. A legmagasabb minőségű kenyérbúzáknak mind keményszeműek. A magyar nemesítők számára is fontos szelekciós tulajdonság munkájuk során a búzaszem textúrája.

Ahhoz, hogy a gyakorlati nemesítésben minél több szempontot figyelembe lehessen venni, hogy minél sikeresebb legyen a nemesítői munka, szükséges a szemkeménység kialakulását, az azt befolyásoló tényezőket is vizsgálat tárgyává tenni. Pályázatunk keretében javaslatot tettünk a keménység kialakulásának, okainak elméleti oldalról is megalapozottabb *in vitro* vizsgálatára. Ehhez egy olyan módszer kialakítására kaptunk lehetőséget, a pályázat

keretében, melyet eddig még nem alkalmaztak. Alapja a heterológ rendszerű fehérje expressziós munka, melynek segítségével nagy mennyiségben állíthatók elő vad típusú és rekombináns fehérjék. Az irodalom tanulsága szerint mind a mai napig egyetlen laboratóriumban sem sikerült expresszálni nagy mennyiségben a friabilin fehérjék egyikét sem, bár több labor, pl. Franciaországban, Angliában és Ausztráliában is komoly erőfeszítéseket tett, ill. tesz.

A kutatás célja

Tanulmányozni a búza endospermiumban expresszálandó friabilin gyűjtőnévvel jelölt fehérjék, funkcióját az endospermiumban, hatását a szemkeménység kialakításában *in vitro* rendszerekben. Heterológ fehérje expressziós rendszerekben termeltetünk 3 fehérjét és azok rekombináns változatait, hogy tanulmányozzuk azokat a fehérje szakaszokat, egyes aminosavakat, melyek fontos szerepet játszanak a fehérje „aktív” szerkezetének kialakításában. Vizsgáljuk továbbá, hogy a GSP-1 fehérje rendelkezik-e enzim aktivitással, s ha igen jellemezzük azt.

Feladatok

A pályázati szerződésben az alábbi munkák elvégzését vállaltuk:

- 1., Friabilin fehérjék expressziója heterológ rendszerben.
- 2., A termelt fehérje azonosítása Western blot, CD spektroszkópia, ill. tömegspektrometriás módszer felhasználásával.
- 3., A bizonyítottan friabilin fehérjék előállítása nagy mennyiségben, ill. kellő mértékű tisztítása a további vizsgálatokhoz.
- 4., A friabilin fehérjék felületi feszültségre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- 5., A GSP-1 fehérjék endoxilánáz aktivitásának mérése.
- 6., A friabilin fehérjék keményítő kötő képességének vizsgálata.
- 7., A búza tartalékfehérjék keményítő kötő képességének vizsgálata.
- 8., Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata a keményítő felszínén.
- 9., Mutáns purB fehérjék expressziója és vizsgálata.
- 10., Helyspecifikus módosítással előállított mutáns purA, purB és GSP-1 fehérjék expressziója és vizsgálata.

Eredmények

1., Friabilin fehérjék expressziója heterológ rendszerben.

Az irodalomból ismert három friabilin fehérje (puroindolinA, puroindolinB és Grain Softness Protein GSP-1) expresszióját bakteriális alapú expressziós rendszerben végeztük. Ehhez a következőkben részletezett kísérleti munkát végeztük el.

Megterveztünk három pár primert az egyes fehérjék génjeinek PCR módszerrel való felszaporításához búza genomi DNS-ből. A primerek tervezésénél figyelembe vettük, hogy a fehérje N terminális végén lévő, 22 aminosavból álló szignál peptid a transzport és az érés során lehasad, így az érett fehérje nem tartalmazza. Mivel a bakteriális rendszerben ez a poszttranszlációs mechanizmus nem létezik, így az ennek megfelelő DNS szakaszt a PCR reakció során kell eltávolítani, hogy korrekt méretű fehérjét kapjunk a bakteriális expresszió eredményeként. A PCR reakció során ezt a szignál szakaszt egy ATG bázishármassal helyettesítettük, mely a metionin nevű aminosav kódoló szekvenciája. A fehérje N-terminálisán szükség van egy Met aminosavra a sikeres bakteriális fehérje expresszióhoz. A kiválasztott bakteriális expressziós vektorba való klónozáshoz szükséges restrikciós endonukleáz hasító helyeket is tartalmazták az általunk tervezett oligonukleotidok, azok 5' végein.

A primerek szekvenciái az alábbi táblázatban olvashatók:

puroindolinA	
Forward primer	<u>CCATGGAAGTTGTTGGCAGTTACG</u>
Reverse primer	<u>GGATCCTCACCAGTAATAGCCAATAG</u>
puroindolinB	
Forward primer	<u>CATATGGAAGTTGGCGGCTGGTAC</u>
Reverse primer	<u>GGATCCTCATCACCAGTAATAGCCAC</u>
Grain Softness Protein-1	
Forward primer	<u>CATATGGTTGCGATAGCGCCTAGTG</u>
Reverse primer	<u>GGATCCTATCAAGTGATGGGGATGTTG</u>

Az aláhúzott szekvenciák a klónozáshoz szükséges restrikciós enzimek hasítási helyét jelölik. purA fehérje esetében az 5' végén az *NcoI* restrikciós enzim hasítási helyét, míg a másik két esetben az *NdeI* enzim hasítási helyét használtunk fel klónozásra. A gén 3' végén mindhárom esetben *BamHI* restrikciós enzim hasítási helyet alkalmaztunk.

A PCR reakció körülményeinek kisebb optimalizálása után az alábbi reakciókörülmények mellett felszaporítottuk az egyes géneket.

Enzim	TripleMaster polimeráz (Eppendorf termék) 5 unit/10µl reakcióelegy
Mg ²⁺	2,5 mM
dNTP	40 µM egyenként
primer	0,5 µM egyenként
templát	20 ng genomi DNS /reakció

A PCR reakció programja:

T _{denaturáció}	95 °C	30 másodperc
T _{kapcsolás}	56 °C	15 másodperc
T _{lánchosszabbítás}	72 °C	15 másodperc

Ciklusok száma 36.

A kb. 400-500 bp hosszú DNS fragmenteket tisztítás nélkül a TOPO-TA klónozó kit (Invitrogen) felhasználásával pCR2.1-TOPO vektorba klónoztuk, a cég által ajánlott recept szerint. A pozitív klónokat baktériumon végzett PCR reakcióval azonosítottuk. Antibiotikummal kiegészített folyadék kultúrában felnevelt baktériumból plazmidot tisztítottunk (QIAGEN plasmid mini kit), hogy ellenőrizzük az inszert szekvenciáját. A nukleotid sorrend meghatározásához az Applied Biosystems szekvenáló rendszerét használtuk, a BigDye 3.1 mixet. A szekvenálást két irányból is elvégeztük M13 Forward és Reverse primerek felhasználásával, 3-3 független, PCR pozitív kolóniából kinyert plazmidon.

A szekvenálás eredményeként kapott adatokat a CHROMAS nevű szoftverrel és a GCG szoftvercsomag segítségével ellenőriztük és vizsgáltuk. Mindhárom friabilin fehérje génhez tartozó egy-egy hibátlan szekvenciát tartalmazó konstrukciót kiválasztottunk a további munkára, a bakteriális expressziós vektorba való szub-klónozásra.

A bakteriális fehérje expresszióhoz a Novagen cég által forgalmazott expressziós vektorokat és gazdasejteket használtuk. Három vektort választottunk ki előzetesen (pET11d, pET17b, pET19b), mely több expressziós variációt biztosít. A pET11d széles körben alkalmazott, mert jól szabályozható fehérje expressziót biztosít. A pET17b egy alternatív vektor, abban az esetben, ha a pET11d vektor nem működik. A pET19b vektor tartalmaz egy immunológiai azonosításra, valamint fehérje tisztítására is használható His tag-et a molekula N-terminálisán, amit egy enterokináz enzimmel lehet eltávolítani a fehérjéről. A pozitív, jó szekvenciájú klónokból az inszertet a megfelelő restrikciós endonukleáz enzimek (*NdeI*, *NcoI*, *BamHI*) segítségével kivágtuk, agaróz gélen elválasztottuk, majd gélből tisztítottuk (QIAGEN gél tisztító kit) segítségével. A vektorokat szintén hasítottuk, agaróz gélen elválasztottuk és gélből tisztítottuk. Következő lépésben T4 DNS ligáz enzim segítségével összekapcsoltuk a

vektorokat és a megfelelő friabilin fehérje géneket. A transzformálás és megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajon való szélesztés után kapott kolóniákat PCR segítségével ellenőriztük. A PCR-hez az adott génre specifikus oligonukleotidokat használtunk forward primernek, valamint reverz primernek a pET expressziós vektor T7 terminátorára specifikus oligonukleotidot T7Rev (melyet nem tartalmaz a pCR2.1-TOPO vektor).

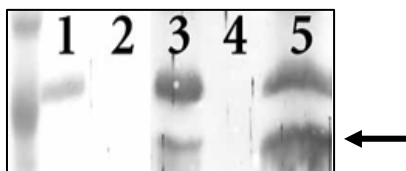
Az egyes friabilin fehérje géneket tartalmazó, PCR pozitív mintákból 3-3 kolóniát felneveltünk antibiotikum tartalmú táptalajon és belőlük plazmidot tisztítottunk a fentebb leírt kit segítségével. Az egyes konstrukciókat restriktációs endonukleáz enzimekkel végzett hasítással is ellenőriztük, mely enzimek inszert, ill. vektor specifikusak, mielőtt expressziós baktériumokba transzformáltuk. Az így ellenőrzött klónokból egyet-egyet kiválasztottunk baktériumban történő fehérjetermeléshez. A fehérje termeléshez új gazdasejtet kell használni, ebbe kell transzformálni az egyes expressziós klónokat. A friabilin fehérjék nagy számú cisztein aminosavat, s nagy számú diszulfid híd kötést tartalmaznak. Ezt figyelembe véve olyan gazdasejtet/sejteket kell választani, melyek lehetővé teszik a fehérjében a diszulfid hidakkal stabilizált megfelelő szerkezet kialakulását. Az alábbi, az irodalomban széles körben és elfogadottan használt, öt gazdasejttel rendelkezünk {AD494(DE3), BL21*trxB*(DE3), Origami(DE3), OrigamiB(DE3) és Rosetta-gami(DE3)} Ebből kipróbáltuk az AD494(DE3), OrigamiB(DE3) és Rosetta-gami(DE3) törzseket. A megfelelő antibiotikum mellett 37 °C-on szaporított baktérium sejtekben akkor indukáltuk IPTG hozzáadásával a fehérje termelést, mikor a szuszpenzió optikai denzitása (OD) elérte a 0,5-0,8 közötti értéket 600 nm hullámhosszon mérve. Az indukciót követően óránként mintát vettünk hat óra hosszan keresztül a baktériumból, majd a maradék baktérium szuszpenziót hagytuk egész éjszakán át rázatni, fehérjét expresszálni. A baktérium mintákat SDS szolubilizáló pufferben oldottuk, forraltuk és az így kapott fehérje oldatot 12%-os akrilamid gélen választottuk el Laemmli szerint. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy hat órás fehérje expresszió elegendő, a baktérium megfelelően nagy mennyiségű fehérjét termel. Mindhárom baktérium törzsben mindhárom fehérje termelődött, de a legerősebbnek az Origami B(DE3) sejtben való fehérje expresszió tűnt az SDS-PA gélelektroforézis alapján.

2., A termelt fehérjék azonosítása

A bakteriális fehérje expresszióval kapott fehérje mérete kicsit nagyobb, mint a búza endospermiumból tisztított érett fehérje mérete. Ez avval magyarázható, hogy a növényi

sejtben az érés során a fehérje N- és C-terminálisáról lehasad néhány aminosav. A mechanizmust nem ismerjük, nem tudjuk, hogy vajon a keményítővel, ill. a lipidekkel való kölcsönhatás során történik-e. Ezért a baktériumban termeltetett fehérje a teljes aminosav szekvenciát tartalmazza, leszámítva a szignál peptidet, ami az endospermium fehérjéiről biztosan lehasad az Endoplazmatikus Retikulumon, vagy a Golgi apparátuson való áthaladás során. A pET19b expressziós vektor segítségével termeltetett puroindolinB fehérje mérete volt a legnagyobb, ami avval magyarázható, hogy az így kapott fehérje még tartalmaz egy 23 aminosav hosszú oligopeptidet, melynek N-terminális végén van a tisztításra és kimutatásra is szolgáló His-tag.

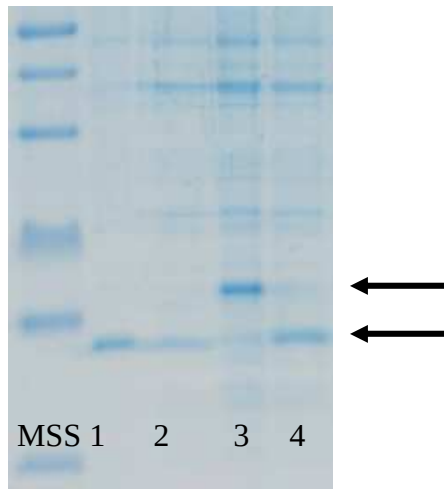
Mindhárom baktériumban termeltetett friabilin fehérjét azonosítottuk az SDS-PAGE elektroforézis során mutatott futási sebességen túl Western blot segítségével is (**1. ábra**). Az SDS gélelektroforézis során elválasztott fehérjéket Bio-Rad semi dry blot készülék segítségével PVDF membránra transzferáltuk és az irodalomban elfogadott protokoll szerint anti-friabilin antitesttel reagáltattuk. A kapott jel, megegyezett az IPTG indukció után megjelent extra fehérje sávjával. A pET19b vektorban expresszált puroindolinB fehérje esetében nem csak anti-friabilin antitestet, hanem anti-His-tag antitestet is használtunk a Western blot módszer szerinti azonosításra. A két antitesttel kapott jel azonos helyen jelent meg a PVDF membránon és az megegyezett az IPTG indukció után kapott extra fehérje sávjával.



1. ábra Baktériumban expresszált friabilin fehérjék vizsgálata Western blot módszerrel.

1., Gazdasejt, csak üres pET plazmidot tartalmaz. **2.**, pur-A-pET vektort tartalmazó expressziós gazdasejt indukció előtt. **3.**, pur-A-pET vektort tartalmazó expressziós gazdasejt indukció után. **4.**, GSP-1-pET vektort tartalmazó expressziós gazdasejt indukció előtt. **5.**, GSP-1-pET vektort tartalmazó expressziós gazdasejt indukció után. Nyíllal jelöltük a friabilin fehérje sávját.

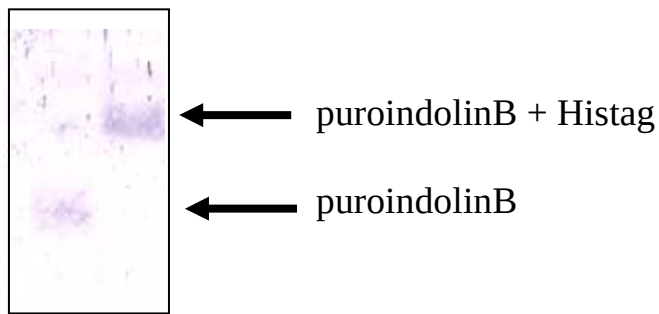
Mint **2. ábrán** látható a fehérje expressziója IPTG indukció nélkül is elindul, ami sajnos jellemző a pET expressziós vektorok nagy részére. Látható továbbá, hogy a Histag-ot tartalmazó fehérje hosszabb, mint a vad típusú fehérje.



2. ábra Baktériumban expresszált puroindolinB fehérje His tag-gal és His tag nélkül.

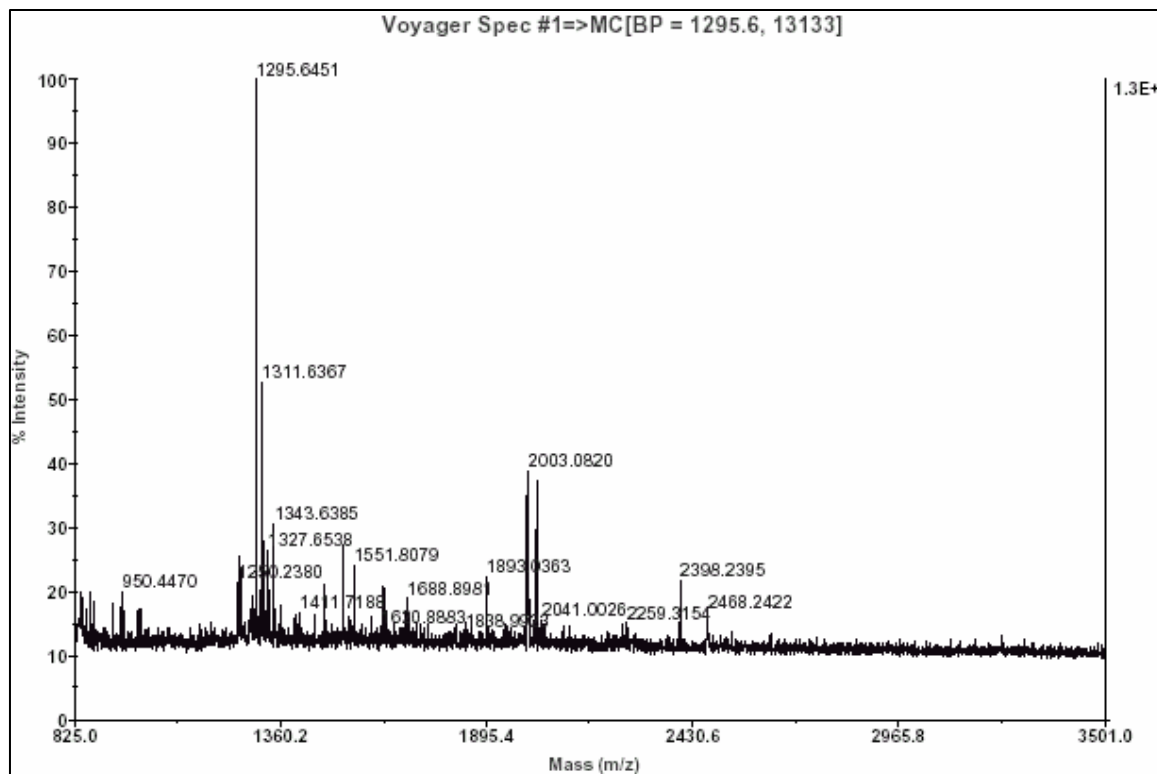
MSS, Molekulatömeg standard. **1.**, purB-pET vektor tartalmú expressziós plazmid indukció után. **2.**, purB-pET vektor tartalmú expressziós plazmid indukció előtt. **3.**, purB-Histag-pET vektor tartalmú expressziós plazmid indukció után. **4.**, purB-Histag-pET vektor tartalmú expressziós plazmid indukció előtt. Nyíllal jelöltük a termelődött puroindolinB fehérje sávját.

További azonosítást végeztünk monoklonális antitest segítségével a baktériumban, pET11d expressziós vektorból expresszált puroindolinA fehérjével (**3.ábra**). Az R-Biopharm Rhone cég által forgalmazott Durotest-P kit-ben található monoklonális antitest specifikus egy adott biotópra, mely csak adott térszerkezetű friabilin fehérjékben található. Az eddig, más laboratóriumokban, *E.coli*-ban termelt puroindolinA és -B fehérjék evvel az antitesttel nagyon gyenge reakciót adtak, amit a nem megfelelő folding-nak tulajdonítanak. Az általunk expresszált puroindolinA fehérje jele Western blot reakcióban sokkal erősebbnek (kb. 50-szer) mondható, de a Coomassie Brilliant Blue festékekkel festett SDS-PAGE gél puroindolin sávjának intenzitása és a Western blot puroindolin sávjának intenzitása alapján az általunk termelt fehérje valószínűleg csak 25-30%-ban tartalmaz megfelelő foldinggal rendelkező molekulákat. További expressziós optimalizálási kísérleteket végeztünk, de nem tudtuk 50% fölé növelni a megfelelő foldinggal rendelkező fehérjék arányát. Kipróbáltunk további expressziós gazdasejteket és különböző hőmérsékleteket, valamint változtattuk indukció előtti baktérium koncentrációt is.



3. ábra Baktériumban expresszált puoroindolinB fehérjék vizsgálata Western blot módszerrel.

A baktériumban expresszált Grain Softness Protein-t SDS-PA gélelektroforézissel történt elválasztás után gélből visszanyertük és MALDI-TOF analízisre együttműködő partnerünkhöz küldtük (**4. ábra**). A GSP fehérje tömegspektrométeres analízise pozitív eredményt adott. A megtalált peptidek a teljes szekvencia 32,5%-át fedik, s így igazoltuk, hogy a baktériumban termelt fehérje aminosav szekvenciája azonos a búzából tisztított fehérje szekvenciájával.



4. ábra baktériumban termelt és tisztított GSP fehérje tömegspektrométeres vizsgálata.

A baktériumban előállított és SDS-PA gélen tisztított fehérjék N-terminálisának aminosav szekvenciáját szintén meghatároztuk, hogy ellenőrizzük nem történt-e valami változás a baktériumban a fehérje termelése során.

A kapott eredmények megerősítették, hogy az expresszió során nem történt semmi hiba, mert az első 10 aminosav mind a három friabilin fehérje esetén megegyezett a DNS szekvenciából származtatott szekvenciával.

3., A friabilin fehérjék előállítása nagy mennyiségben, ill. kellő mértékű tisztítása.

A friabilin fehérjék nagy mennyiségű expresszióját 2 literes rázatott Erlenmeyer lombikokban végzett 500 ml-es folyadék kultúrában végeztük. Expressziós gazdasejtbe frissen transzformált, PCR reakcióban ellenőrzött, egyetlen kolóniából indultunk ki. Az 5 ml folyadékban egy éjszakán át felnevelt baktériummal inokuláltunk 500 ml, megfelelő antibiotikummal kiegészített LB táptalajt. Három-négy órás ráztatás után megmértük az optikai denzitást. Mikor az elérte a 0,5-0,8 közötti értéket, 1 mM IPTG hozzáadásával indítottuk a fehérje termeltetést. Hat óra további folyamatos ráztatás után centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket és 20 °C-on tároltuk további felhasználásig. Kis mennyiségű mintából, SDS szolubilizáló oldattal kapott fehérje oldatban SDS-PA gélelektroforézissel kimutattuk a termelődött friabilin fehérjét.

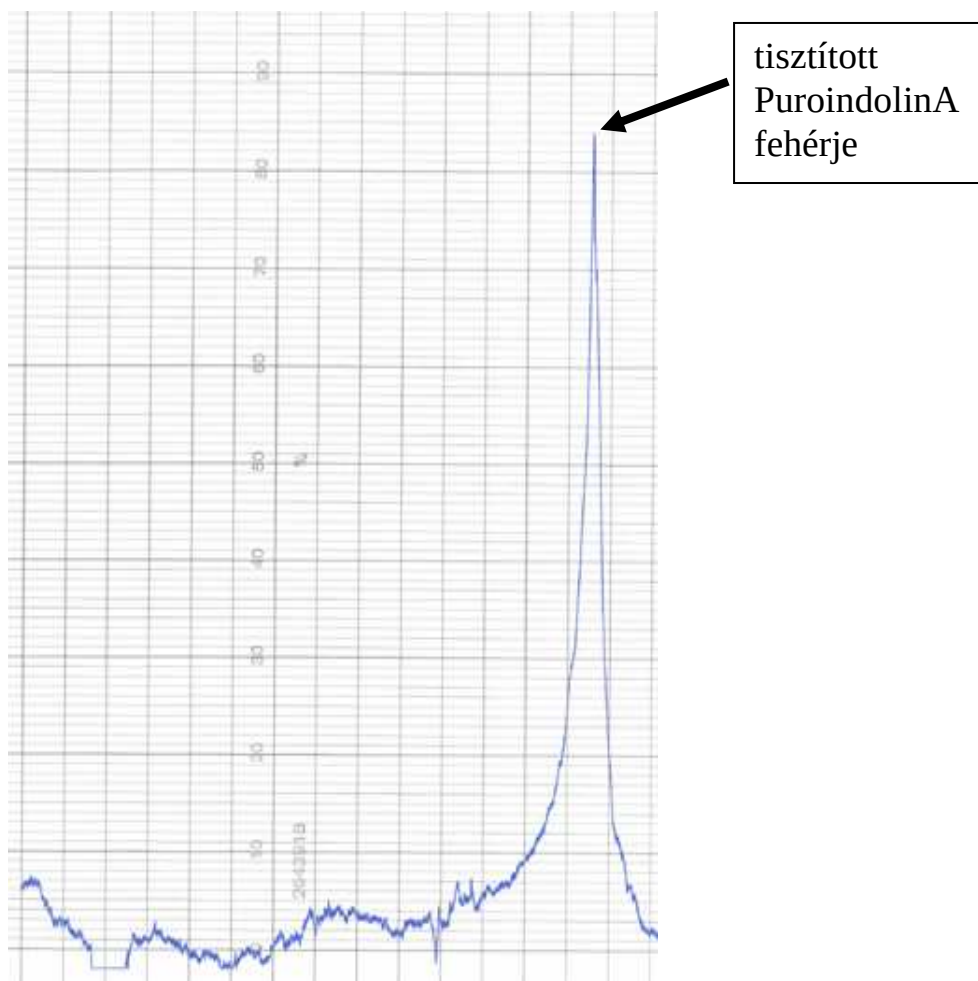
Sikerült több száz milligramm mennyiségben előállítani mindhárom friabilin fehérjét oldható formában, ill. a puroindolinB fehérjét His-taggal is. Ez a fehérje szennyezett bakteriális fehérjével, így további tisztítási lépések szükségesek.

További spektroszkópiai vizsgálatokhoz nagy mennyiségű tisztított fehérjére van szükség. Tisztításhoz FPLC kromatográfiás módszert használtunk MonoS ioncserélő tölteten (5. ábra).

Nagy problémát jelentett a baktériumban expresszált fehérjék oldatba vitele nagy koncentrációban, SDS hiányában. Több oldószert kipróbáltunk, így a Tris/ecetsav rendszert különböző pH értékek mellett (6,8; 7,3; 7,8), valamint a Na-acetát/ecetsav rendszert (pH 5,2; 6,0) de nagy áttörést nem értünk el. Kísérleteket végeztünk a fehérje renaturációjára és refoldingjára is DTT-s és/vagy ureás oldatban történő redukciót és/vagy renaturációt követő DTT, ill. urea mentes oldattal szemben végzett dialízissel. További vizsgálatokat végeztünk enyhén savas puffer (pH 7,8) melletti híg só oldattal (50 mM, 100 mM NaCl), valamint Triton

X-114 tartalmú pufferrel is. (A 70%-os etanol, vagy az 50%-os n-propanol oldat egyáltalán nem adott értékelhető eredményt.)

Ezen kísérletek után sem tudtunk nagy koncentrációjú friabilin oldatokat előállítani. Ez bizonyára kapcsolatban van azzal, hogy a baktériumban előállított fehérje magasabb szerkezeti formái a heterológ rendszerben termelt fehérje esetében nem minden molekulára egyezik meg a natív fehérje magasabb szerkezeti formáival, ill. hogy a fehérje csak részben veszi fel a natív fehérjére jellemző szerkezetet.



5. Ábra baktériumban expresszált PuroindolinA fehérje tisztítása mono S ioncserélő oszlopon.

Az alacsony koncentráció ellenére is rendelkezünk oldható, baktériumban expresszált, friabilin fehérjékkel, melyek kromatográfiás lépés(ek) során tisztíthatók.

4., A friabilin fehérjék felületi feszültségre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Ezt a kísérletet nemzetközi együttműködés (Institute of Food Research, Norwich, Egyesült Királyság) keretében terveztük végrehajtani. Mivel a berendezéshez nem tudtunk hozzáférni, ezért a feladat végrehajtását elhalasztottuk. Reményeink szerint a méréseket ez év folyamán el tudjuk végezni.

5., A GSP-1 fehérjék endoxilanáz aktivitásának mérése.

Az általunk előállított rekombináns GSP-1 fehérje arabinoxilanáz aktivitását azurinnal keresztkötött búza arabinoxilán (AZCL-arabixylan; Megazyme) szubsztráton teszteltük. Negatív kontrollként GSP-1 gént nem hordozó *E. coli* extraktját, pozitív kontrollként búzaliszt ecetsavas kivonatát használtuk. A rekombináns fehérje korrekt térszerkezetét keményítőkötéssel ellenőriztük. Eredményeink szerint a GSP-1 fehérjének nincs arabinoxilanáz aktivitása.

6., A friabilin fehérjék keményítő kötő képességének vizsgálata.

Keményítő szemcséket preparáltunk puha (Riband, Mv Matyó), kemény (Mercia) és durum (Svevo, Martondur) búzafajták lisztjéből. A preparátumokból kisméretű affinitás kromatográfiai oszlopokat hoztunk létre, ezeken végeztük a kísérleteket. Puhaszemű (Riband) búzából Triton X-114-el készült kivonat felvitele, és a keményítő oszlopok mosása után az oszlopokról friabilint, és néhány nagyobb molekulatömegű (33-54 kDa) fehérjét lehetett eluálni az SDS-PAGE tanúsága szerint. A 15 kDa-nál található sávról anti-friabilin ellenanyag segítségével Western-blottal bizonyítottuk, hogy friabilint tartalmaz. A kivonatban található fehérjék nagy része nem kötődött az oszlophoz, tehát a kötés specifikus volt. A friabilin kötődése mind a háromféle keményítőn megtörtént (durum keményítőre ezt még nem írták le korábban).

A kötési kísérleteket megismételtük FPLC-n tisztított friabilinnal is. A tisztított friabilin szintén specifikusan kötődött a keményítő oszlophoz.

Az általunk előállított rekombináns puroindolinA, puroindolinB és GSP-1 fehérjék szintén specifikusan kötődtek a keményítő oszlopokhoz, amit SDS-PAGE és Western-blot kísérletekkel bizonyítottunk.

7., A búza tartalékfehérjék keményítő kötő képességének vizsgálata.

Puhaszemű (Riband) búzából Triton X-114-el készült kivonatot keményítőoszlopra kötöttük és eluálás után a fehérjéket SDS-PAGE-n elválasztottuk. Az elválasztott fehérjéket Western-blotban tartalék fehérjék ellen készült ellenanyaggal reagáltatva azt tapasztaltuk, hogy számos búza tartalékfehérje kötődik a keményítő szemcsékhez. A kísérletet megismételtük 50 % izopropanollal készült kivonattal is, amely elsősorban gliadin fehérjéket tartalmaz. SDS-PAGE-n történő elválasztás után azt tapasztaltuk, hogy egy 30 kDa méretű fehérje nagy mennyiségben kötődött a keményítő szemcsékhez. Ezt a fehérjét a tartalék fehérjék ellen készült szérum felismerte.

A kötési kísérleteket megismételtük tisztított keményítő sós izopropanolos (50 % i-PrOH, 50 mM NaCl) kivonatával is. A kivonatban található tartalék fehérjék szintén specifikusan kötődtek a keményítő oszlophoz, ami bizonyítja, hogy nem a lisztben esetleg jelen lévő szennyező anyagok okozták a kötődést.

A 90 %-os izopropanollal zsírtalanított keményítő szemcsékkel végzett kísérletek eredménye szerint a tartalék fehérjék keményítő kötéséhez a lipidekre nincs szükség; a zsírtalanítás hatására a kötött tartalék fehérjék mennyisége nem változott.

A keményítőszemcsékhez kötött, a búza szemkeménységét befolyásoló fehérjék további funkcionális jellemzését külföldi együttműködésben folytattuk. Ehhez a jellemzendő fehérjéket két különböző búzafajtából nyertük ki: Riband puhaszemű búzából (vad típusú puroindolinokat tartalmaz) és Ofanto durum búzából (puroindolinokat egyáltalán nem tartalmaz). Az eljárás során a keményítőszemcséket finomlisztből, illetve teljes kiőrlésű lisztből/búzadarából vontuk ki. A feladat megvalósítása közben a világon elsőként hasonlítottunk össze több különböző, laboratóriumi körülmények között használatos, vízmentes, illetve vizet is felhasználó keményítő tisztítási eljárást a kapott termék szemcsefelszíni fehérjetartalma szempontjából. Ezen összehasonlítás célja annak bizonyítása volt, hogy a vizsgált gliadin típusú fehérjék már a búzaszemben is megtalálhatók a keményítőszemcsék felszínéhez kötve – nem csupán vizes mosás során tapadnak ki. A következő keményítő-kinyerési módszereket hasonlítottuk össze:

- Vizes mosás vízzel gyúrt téstából
- Szemcseméret szerinti frakcionálás
 - Malmi frakciók
 - Finomliszt frakcionálása szitasorozattal – 38 µm alatti frakció elkülönítése
- Sűrűség szerinti frakcionálás
 - Friss búzadara centrifugálása kloroformban

- Finomliszt centrifugálása különböző összetételű kloroform - diklór-metán elegyekben
- Vákuumban szárított liszt további őrlése golyós malomban, kloroform jelenlétében, majd centrifugálás kloroformban, szükség szerint kloroform és szén-tetraklorid megfelelő arányú elegyében

A vizes mosás széles körben alkalmazott módszer, azonban több kutatócsoport is felhívta a figyelmet arra, hogy az eljárás során a búza endospermium fehérjemátrix egyes komponensei képesek lehetnek kitapadni a keményítőszemcsék felszínére, ezért mindig szükséges bizonyítani, hogy a vizsgált fehérje/fehérjefrakció jelenléte nem műtermék. Eredményeink alapján a vizes mosással tisztított keményítő fény- és pásztázó elektronmikroszkópos képe a legtisztább, szemcsefelszíni fehérjetartalma a legkisebb a vizsgált minták között.

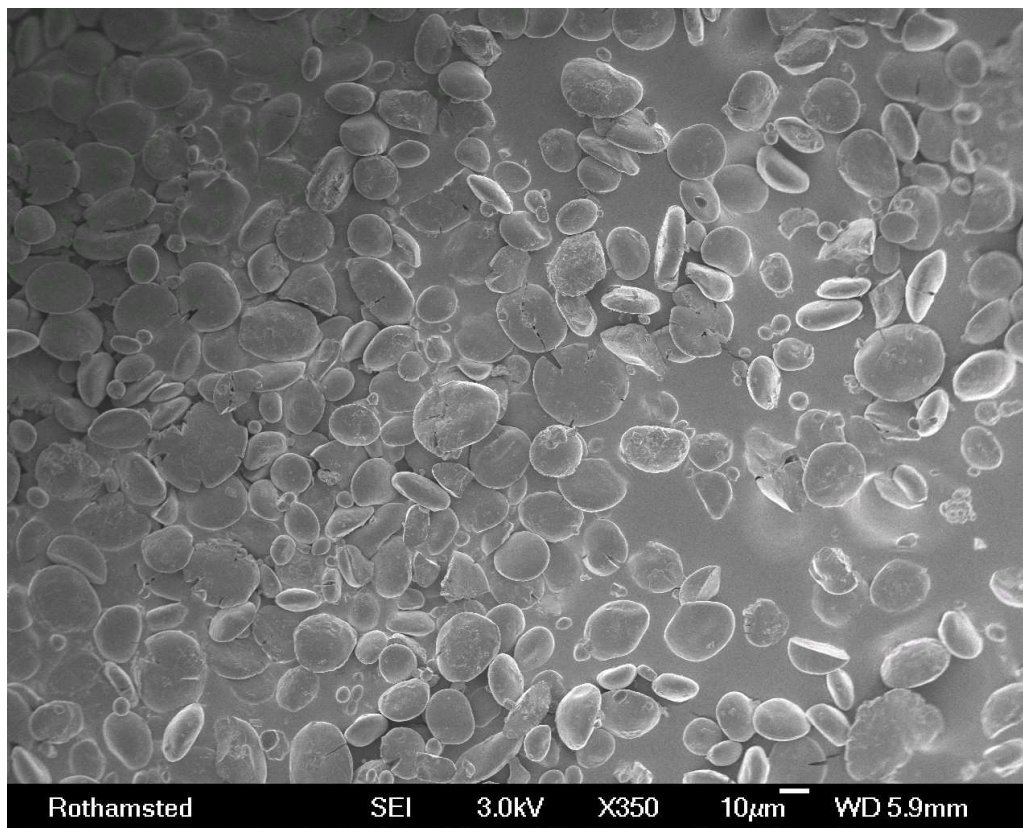
A szemcseméret szerint elválasztott malmi frakciók közül a legalacsonyabb fehérjetartalmú frakció nagy mennyiségben tartalmaz ép és szabad (hozzátapadt fehérjemátrix törmeléktől mentes) keményítőszemcsét, ugyanakkor jelentős mennyiségű, a keményítőszemcsékhez hasonló méretű fehérjemátrix darabot is.

A finomliszt 38 µm-nél kisebb szemcseméretű frakciója még nagyobb mennyiségben tartalmaz fehérjemátrix-törmeléket.

A sűrűség szerint szétválasztott friss búzadara illetve finomliszt keményítőben gazdag (az oldószerrel nagyobb sűrűségű) frakciója szintén keményítőhöz nem kötött fehérjével szennyezett (mátrix a külön nem vált szemcsék között).

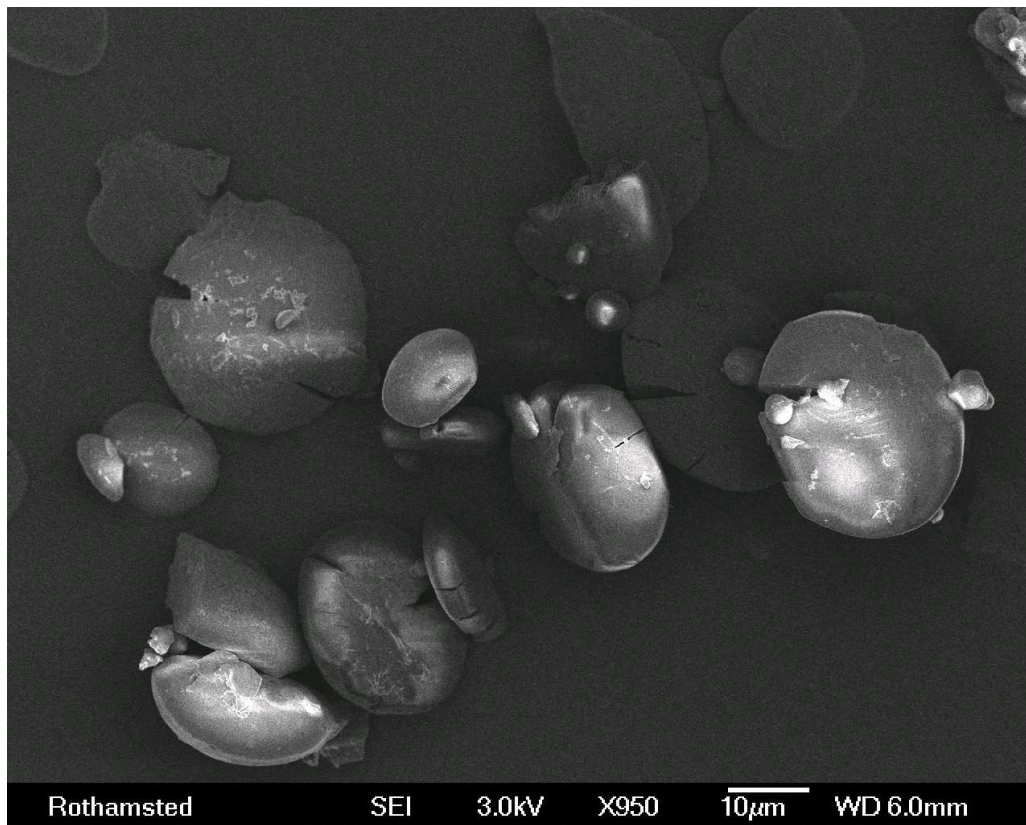
Az általános malmi őrlés során a keményítő-fehérjemátrix szétválás nem teljes. A finomlisztben is találhatunk a keményítőszemcsékhez hasonló méretű fehérjetörmeléket, illetve olyan endospermium darabokat, melyek a szorosan rendezett keményítőszemcsék közötti hézagokban mátrixfehérjéket tartalmaznak. Ez okozza, hogy egyszerű frakcionálással nem lehet kellő tisztaságú keményítőt előállítani. A probléma kiküszöbölhető, ha olyan alaposan őröljük az alapanyagot, hogy gyakorlatilag minden keményítőszemcse különváljon az őket összekötő fehérjemátrixtól. Ehhez finomlisztet vákuumban szárítottunk, majd golyós malomban, kloroform jelenlétében egy óra hosszáig őröltünk. Ezután a keményítőt a jelentősen kisebb sűrűségű fehérjétől kloroformban vagy (szükség szerint) kloroform - szén-tetraklorid elegyben centrifugálással elválasztottuk. Az így kapott minta fénymikroszkópos képe ugyanolyan tiszta volt, mint a vizes mosással kivont keményítőé, ugyanakkor a szemcsék testében repedések mutatkoztak. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján is a minta tisztasága lényegében megegyezett a vízzel kinyert keményítőével, jól látható volt

viszont a szemcsék nagymértékű repedezettsége, töredezése is, ezeket valószínűsíthetően a rendkívül intenzív őrlés okozta (**6-7. ábra**).



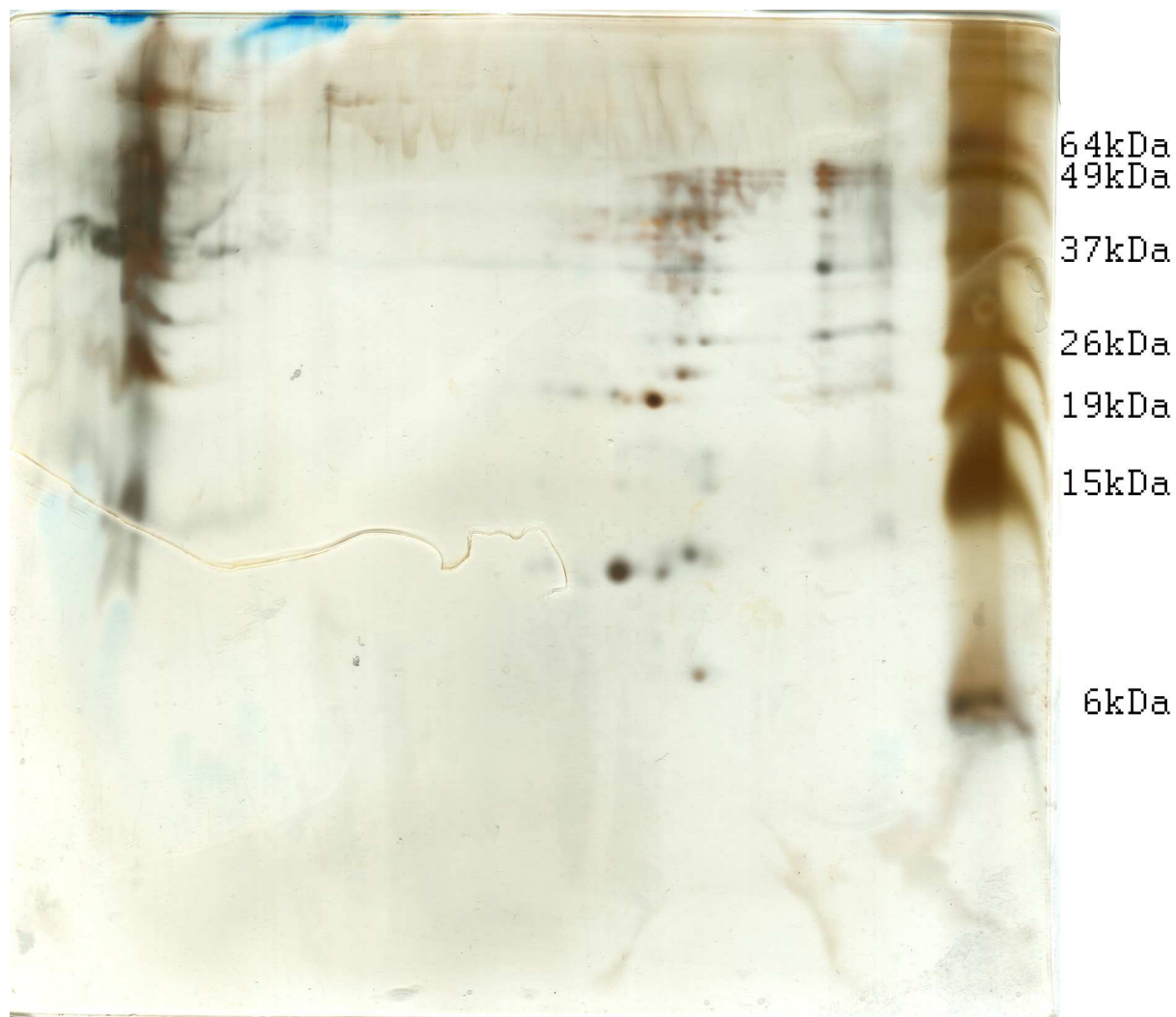
6. ábra: A kloroformban őrlött, majd centrifugált minta nem tartalmaz fehérje mátrix szennyezést

A mikroszkópos vizsgálatok után az egyes minták felszíni fehérjetartalmát SDS-PAGE-sel hasonlítottuk össze. Minden más módon előállított keményítő több fehérjét hordott a felszínén, mint a vízzel mosott minta, akár 10-20-szoros mennyiséget is. A vízmentesen kivont keményítők közül a kloroformban őrlött minta szemcséin találtuk a legkevesebb fehérjét (3-5-szörös a vizes módszerhez képest). Ez utóbbit kétdimenziós PAGE-sel (ízoelektromos-fókuszálás + SDS-PAGE) is hasonlítottuk a vízzel mosott keményítőhöz. A kapott eredmények alapján minden olyan fehérje, mely jelen van a vízzel kinyert keményítőszemcsék felszínén, megtalálható a legtisztább vízmentesen preparált minta szemcséin is (**8-9. ábra**). A továbbiakban ezért kizárólag vízzel mosott keményítővel dolgoztunk.

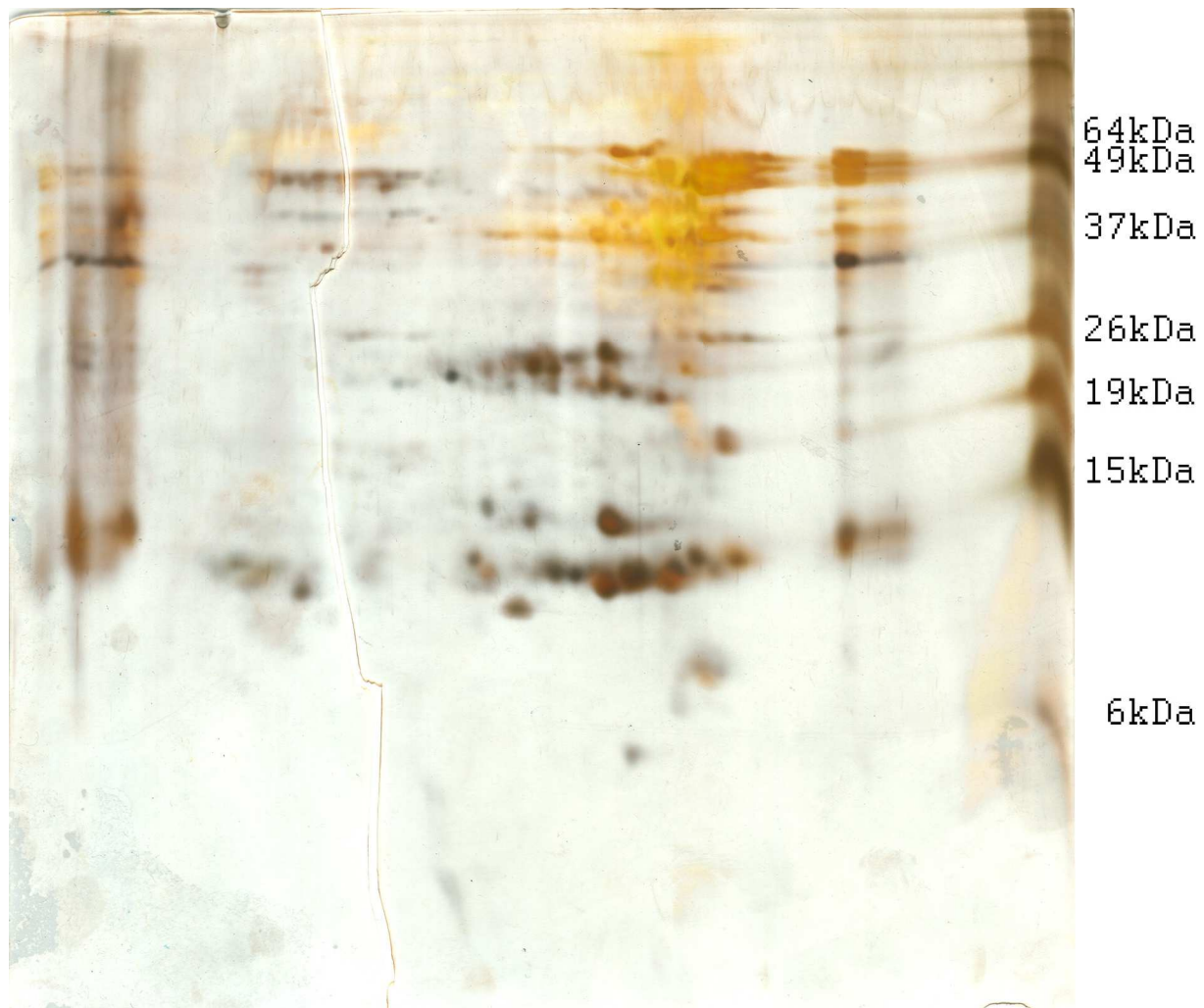


7. ábra: A kloroformban őrölt minta keményítőszemcséi igen repedezettek, töredezetek

A keményítőszemcsé-felület fehérjéinek kinyerésére több módszert is teszteltünk. Az egyik fő fehérjefrakció a friabilin. Irodalmi adatok tanúsága szerint leghatékonyabban 50 % izopropanol, 50 mM NaCl oldatával vonható ki. A gliadin típusú fehérjék egyik legáltalánosabb oldószere az 50 %-os n-propanol. Munkánk során mindkét oldószert teszteltük, különböző hőmérsékleteken. A legjobb eredményt az 50 % izopropanol, 50 mM NaCl oldattal kaptuk, 60 °C-on, 2-4 óra rázatással (ha a szemcséket ugyanezen oldószerben szonikáljuk, 60 fok helyett elegendő szobahőmérsékleten rázatni a mintát – nagy mennyiségeknél azonban a szonikálás optimális időtartamát igen nehéz meghatározni). Ezzel a módszerrel a keményítő felszínéhez erősen kötődő fehérjék is kivonhatók, míg a többi eljárással csak olyan fehérjét tudtunk oldatba vinni, melyek *in vitro* nem képesek keményítőhöz kötődni. Az oldás befejezte és a keményítőszemcsék eltávolítása után kétszeres térfogat acetont adtunk a mintákhoz, majd éjszakán át -20 °C-on tároltuk őket. A kicsapódott fehérjéket centrifugálással összegyűjtöttük, szobahőmérsékleten egy napon át szárítottuk, végül 10mM pH 4,0 NaAc pufferben oldottuk.



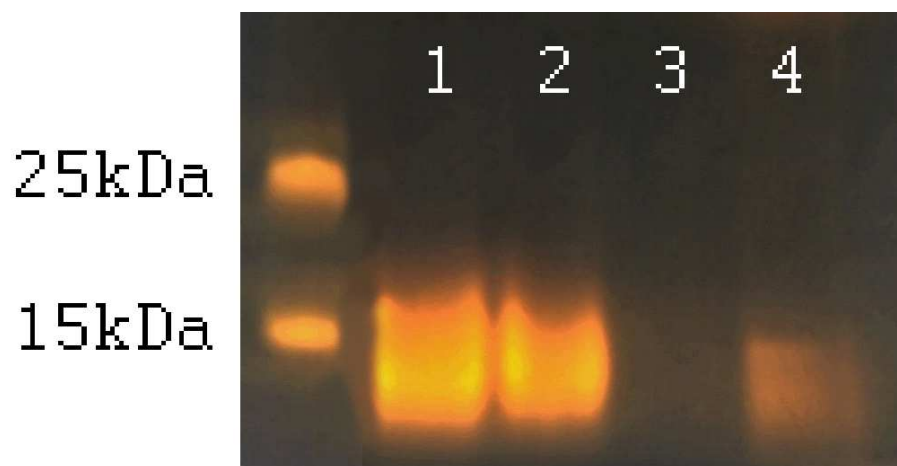
8. ábra: Vízrel kinyert keményítőszemcsék felszíni fehérjetartalmának 2D PAGE képe. (A vízszintes dimenzió izoelektromos fókuszálás pH 3-10-ig, a gél jobb szélén molekulatömeg marker látható)



9. ábra: Kloroformban őrölt minta keményítőszemcséi felszíni fehérjetartalmának 2D PAGE képe. (A vízszintes dimenzió izoelektromos fókuszálás pH 3-10-ig, a gél jobb szélén molekulatömeg marker látható)

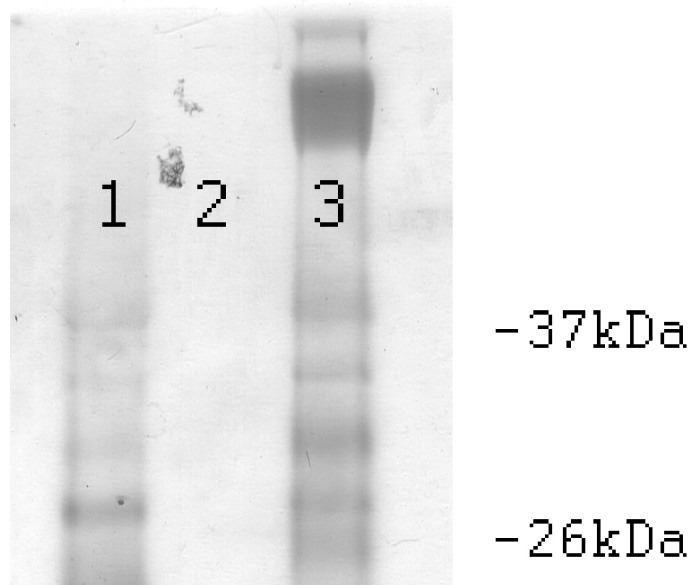
A különböző fehérjetípusok elválasztását nagynyomású folyadék-kromatográfiás rendszerrel (HPLC) végeztük. Először reverz fázisú oszlopot alkalmaztunk, acetonitril gradiens mellett. Hogy a fehérjék az elválasztás után is megtartsák funkcionális tulajdonságaikat, a mintákat nem redukáltuk és nem alkiláltuk. Ezen körülmények között, reverz fázison nem tudtuk elválasztani a komponenseket. Kationcserélő oszlopon jelentősen jobb eredményt kaptunk – a tisztított friabilin frakció (mely a puroindolin fehérjéket tartalmazza) 100%-ban gliadinmentes, míg a tisztított gliadin típusú frakció csupán elenyésző, egyedül a Durotest monoklonális antitesttel kimutatható mennyiségű puroindolint tartalmazott. A durum alapanyag (Ofanto búza) puroindolinokat egyáltalán nem tartalmaz, így a belőle tisztított, keményítőhöz asszociált, gliadin típusú fehérjefrakció is 100%-ban puroindolin-mentes.

A keményítőkötő-képesség vizsgálatához Riband és Ofanto búzákból vizes mosással kinyert keményítőszemcsék felszíni fehérjéit Proteináz K-s emésztéssel eltávolítottuk. Az így kapott, illetve a Sigma-tól vásárolt búza- és burgonyakeményítőkből készített oszlopok tisztaságát, fehérjementességét vak kísérletben, SDS-PAGE-sel, illetve Durotest antitesttel ellenőriztük. A rendszer működését Riband búza lisztjének Triton X-114-es kivonatával teszteltük (a használt kivonat nagy mennyiségű puroindolint tartalmaz, az első *in vitro* puroindolin - keményítő kötéshez így nyerték ki a fehérjét). Miután pozitív eredményeket kaptunk, a kromatográfiásan tisztított mintákat vittük fel az oszlopokra. Az elválasztott gliadin, illetve friabilin frakciók keményítő-affinitásában különbséget nem kaptunk – mindkét típus az összes használt keményítőhöz kötődött (**10-11. ábra**). Mivel a gyári keményítőt készítése során zsírtalanítják, a kapott eredmények alapján feltételeztük, hogy a szemcséken található lipidrteg nem szükséges a kötéshez (l. még: kötés izopropanollal kezelt keményítőhöz).

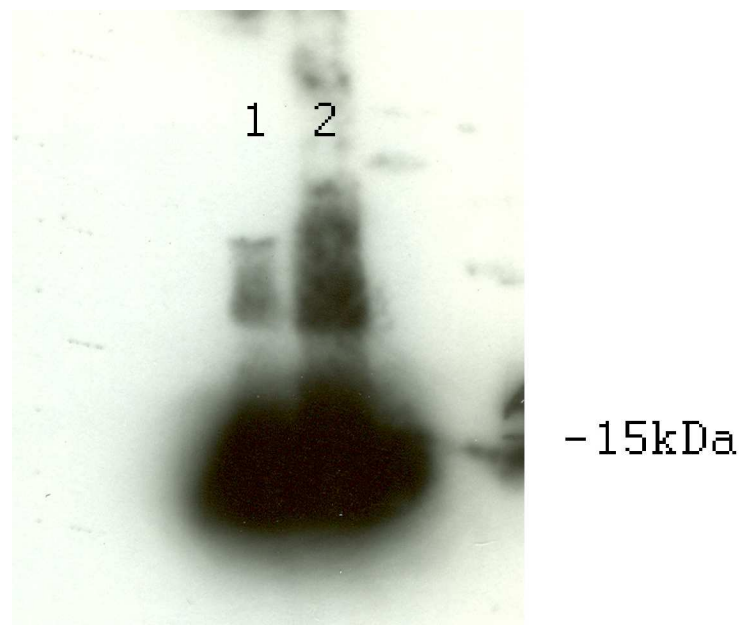


10. ábra: HPLC-vel tisztított friabilin frakció (Riband búzából) kötése keményítőhöz. 1, tisztított friabilin; 2, ki nem kötött fehérje; 3, mosás; 4, kötött fehérje

A keményítőhöz kötődő puroindolinokat Durotest antitesttel (**12. ábra**), a szintén kötődő gliadin frakciót búza gliadin frakciójára specifikus antitesttel azonosítottuk. A gliadin frakció SDS-PAA gélen legprominensebb sávban szembetűnő komponensének N-terminálisát megszekvenáltuk, az eredmény alapján a fehérje α -gliadin (Riband és Ofanto búzában egyaránt). Az α -gliadinok az endospermium-fehérjék prolamin csoportjába tartoznak, nagy mennyiségben vannak jelen a búzaszem fehérje mátrixában.



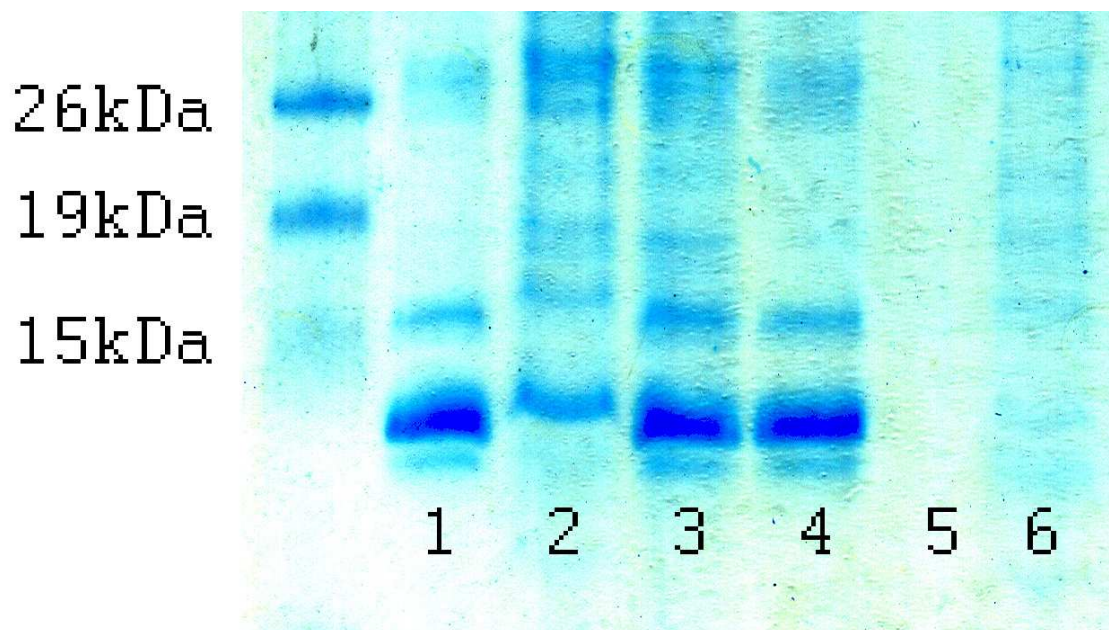
11. ábra: HPLC-vel tisztított gliadin frakció (Ofanto búzából) kötése keményítőhöz. 1, tisztított gliadin frakció; 2, mosás; 3, kötött fehérjék



12. ábra: Puroindolinok azonosítása Durotest antitesttel. 1, Riband keményítőből; 2, R. lisztből

A vízzel mosott keményítőszemcsék felszínén lipidréteg található (az amiloplaszt membrán maradványa), melyet a Proteináz K-s kezelés nem távolít el. Annak felderítésére, hogy ez a lipidréteg szerepet játszik-e a szemcse-fehérje kölcsönhatásban, a Proteináz K-val kezelt keményítőt egy óra hosszan rázattuk 9:1 izopropanolban, illetve vízzel telített n-butanolban.

Irodalmi adatok alapján a 9:1 izopropanol hatékonyan eltávolítja a keményítő felszínén található poláris lipideket, míg a vízzel telített n-butanolt általánosan használják gabonalisztek teljes zsírtalanítására. Pufferes mosás után megvizsgáltuk, képesek-e a gliadin típusú illetve a friabilin fehérjék kötődni az így előállított oszlopokra. Bár a megkötődött friabilin (puroindolin) mennyisége a kontrollhoz képest kevesebb, a kapott eredmények alapján a kezelés nem akadályozza meg a fehérjék kölcsönhatását az oszloppal (**13. ábra**) Ez összhangban van azzal, hogy a vizsgált fehérjék képesek a gyári keményítőhöz kötődni (lásd fentebb).



13. ábra: n-butanolos kezelés hatása a puroindolin - keményítő kötésre. 1, és 3, puroindolin minta; 2, kontrolloszlopra kikötött fehérje; 4, n-butanollal kezelt oszlopra nem kötött fehérje; 5, mosás; 6, n-butanollal kezelt oszlopra kikötött fehérje

8., Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata a keményítő felszínén.

Friabilint és tartalék fehérjéket is tartalmazó kivonatokat keményítő oszlopra kötöttünk és a mosás után eluálható fehérjéket SDS-PAGE-n elválasztottuk. A friabilint különböző mennyiségben tartalmazó kivonatokkal kapott eredmények összevetésével megállapítottuk, hogy a keményítőhöz köthető 30 kDa méretű tartalék fehérje mennyisége erősen függ a jelenlévő friabilin mennyiségétől; azzal fordítottan arányos.

9., Mutáns *purB* fehérjék expressziója és vizsgálata.

A keményítőhöz kötődő tartalékfehérjék vizsgálata számos új eredményt hozott (lásd 7. pont), ugyanakkor a tervezettnél több időt vett igénybe, ezért a mutáns puroindolin fehérjék

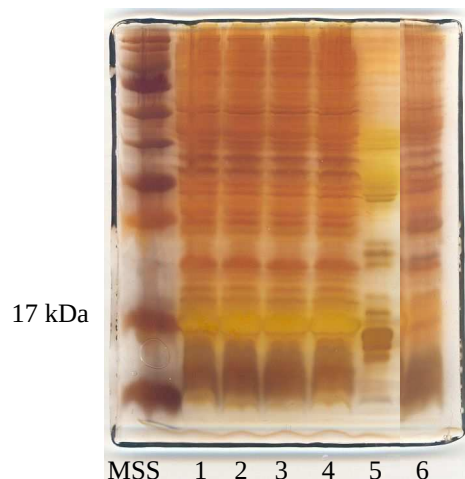
létrehozására és vizsgálatára nem jutott elég időnk. Mivel a természetben előforduló puroindolinB mutánsokat már több kutatócsoport vizsgálta, úgy gondoltuk, hogy az általunk létrehozandó puroindolinA mutánsok vizsgálata (lásd 10. pont) több új tudományos eredményt hozhat. Ezért a 9. pontban meghatározott feladatok végrehajtását későbbre halasztottuk és a 10. pontban meghatározott feladatokat hajtottuk végre 2007-ben.

10., Helyspecifikus módosítással előállított mutáns *purA*, *purB* és *GSP-1* fehérjék expressziója és vizsgálata.

A puroindolinA génre megfelelő primereket terveztünk három mutáns létrehozásához:

1. C56S, C76S: a triptofán gazdag hurok nyakánál található cisztein hidat szünteti meg.
2. C48S: az N-terminálist stabilizáló cisztein hidat szünteti meg.
3. W66A, W68A, W69A, W71A, W72A: a triptofán gazdag régióban található triptofánokat cseréli le alaninra.

A mutáns géneket PCR segítségével állítottuk elő az általunk kifejlesztett módszer szerint (Nagy és mtsai, 2007), és pUC18 vektorba klónoztuk. A DNS szekvenciák ellenőrzése után pET15b vektorba szubklónoztuk, majd *E. coli* Origami-B sejtekbe transzformáltuk. A mutáns fehérjéket az 1. pontban leírt eljárás szerint termeltettük (**14. ábra**). A termelt fehérjék funkcionális vizsgálata jelenleg folyik.



14. ábra: Mutáns puroindolinA fehérjék bakteriális termelése. MSS, Molekulatömeg standard, 1., PuroA C56S-C76S, 2-3., PuroA C48S, 4., PuroA W66A-W68A-W69A-W71A-W72A, 5., búza Triton X114 kivonat 6., *E. coli* kontrol. A mutáns fehérjék a 17 kDa méretű standarddal egy magasságban láthatóak arany színű sávként.

Publikációk:

1. Bakó Ambrus, Gárdonyi Márk, Tamás László: A búza endospermium szerkezetét meghatározó fehérjék funkcionális vizsgálata. (2005) In: Kertész Zoltán (szerk.): XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest. P. 58.
2. Ambrus Bakó, Márk Gárdonyi, László Tamás: Study of the Proteins Determining Endosperm Texture of Wheat. (2005) In: 4th European Young Cereal Scientist and Technologist Workshop, Bécs, Ausztria. P. 24.
3. Ambrus Bakó, Márk Gárdonyi, László Tamás: Study of the Proteins Determining Grain Hardness of Wheat. (2005) In: 5th International Conference of PhD Students, Agriculture, Miskolc. Pp. 1-5.
4. István Csóti, Ambrus Bakó, László Tamás, Márk Gárdonyi: Investigation of the starch-binding properties of wheat friabilin. (2005). VIII. Magyar Növényélettani Kongresszus, 2005. Szeged. Acta Biologica Szegediensis 49(1-2):29-30
5. Ambrus Bakó, Márk Gárdonyi, László Tamás: In vitro starch binding experiments: study of the proteins related to grain hardness of wheat. (2005) 7th International Wheat Conference (Mar del Plata, Argentina, 27 November – 2 December 2005. p. 93)
6. Bakó Ambrus, Tamás László, Gárdonyi Márk: A Szemkeménység MolekulárisHáttér: Búzafehérjék Keményítőköti Képességének Vizsgálata. (2006) In: Veisz Ottó (szerk.): XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest. P. 59.
7. A. Bakó, M. Gárdonyi, L. Tamás: Interaction of the Starch Granule Surface and Associated Proteins (2006) Gluten Workshop (San Francisco, USA, 14-16 September 2006. p. 16.)
8. Zs. B. Nagy, M. Gárdonyi, A. Mészáros, Z. Varga-Orvos, R. G. Solomon, L. Tamás (2007) Multiple site-directed mutagenesis strategy based on total RNA and RT-PCR method. *Mol. Biotechnol.* 37(3):206-211

Várható publikációk:

1. M. Gárdonyi, A. Bakó, P.R. Shewry, L. Tamás: Comparison of wet and dry wheat starch extraction methods.
2. A. Bakó, M. Gárdonyi, L. Tamás, P. R. Shewry: *In vitro* binding of α -gliadin to wheat starch granules.
3. M. Gárdonyi, A. Bakó, L. Tamás: Functional properties of artificial puroindoline A mutants.

Hasznosítás:

A munka alapvetően elméleti jellegű, az eredmények közvetlen alkalmazására nincs lehetőség. A szemkeménység biokémiai alapjainak megértése a későbbiekben segítheti a kenyérbúza nemesítését.

Összefoglalás

A pályázat keretében felszaporítottuk, és klónoztuk 3 friabilin fehérje génjét. A klónozott géneket *E. coli*-ban kifejeztettük. Optimalizáltuk a heterológ expresszió körülményeit, igazoltuk, hogy a termelt fehérjék szerkezete megegyezik a természetes friabilinekéval és nagy mennyiségben előállítottuk a friabilin fehérjét. A puroindolinA génből létrehoztunk 3 mutáns változatot, hogy a cisztein hidak és a triptofán gazdag hurok szerepét tudjuk vizsgálni. A mutáns fehérjét *E. coli*-ban kifejeztük.

A termelt fehérjékkel funkcionális vizsgálatokat végeztünk. Megállapítottuk, hogy a GSP-1 fehérje nem rendelkezik arabinoxilánáz aktivitással. Bizonyítottuk, hogy mind a természetes eredetű, mind a heterológ rendszerben előállított friabilin fehérjék specifikusan kötődnek a tisztított búzakeményítőhöz. Először vizsgáltuk durum búzából származó keményítő friabilin kötő képességét, és igazoltuk, hogy az a kenyérbúzából izolált keményítőhöz hasonlóan köti a friabilineket.

A friabilinek keményítő kötésének vizsgálata során észleltük, hogy egy kb. 30 kDa méretű tartalékfehérje nagy mennyiségben kötődik a keményítőhöz. Munkánk során meggyőzően bizonyítottuk, hogy az általunk megfigyelt gliadin típusú fehérjefrakció valóban jelen van az érett keményítőszemcsék felszínén, nem csupán a vizes tisztítás során kötődik ott meg. Ezek a fehérjék képesek a keményítőhöz kötődni *in vitro*, puroindolinok jelenlétében és hiányában egyaránt. Keményítő iránti affinitásuk a keményítő típusától független, izopropanollal- illetve *n*-butanollal zsírtalanított keményítőhöz is képesek kötődni.

Az α -gliadinok és a keményítő közötti erős kötés magyarázhatja azt a tényt, hogy ha nincs jelen mindkét vad típusú puroindolin, a búzaszem kemény. A szemcseszerkezet, a keményítő töredezettségének mértékével együtt (mely utóbbi szintén a szemkeménységtől függ) jelentősen befolyásolja, hogy egy adott búzafajta milyen termék, termékek előállítására alkalmas. A modern gabonatudomány egyik legfontosabb feladata egy-egy végtermék előállítására különösképpen alkalmas célfajták nemesítése. A szemkeménység molekuláris hátterének alaposabb megértése előrelendíti ezt a folyamatot. A puroindolinok és a szemkeménységet befolyásoló tartalékfehérjék vizsgálatával úttörő munkát végzünk, mely lehetővé teszi a keménység szélesebb látókörű szemlélését, megértését.

Budapest, 2008. február 28.

Dr. Gárdonyi Márk

témavezető