

**BÚZA ALEGYSÉGFEHÉRJÉK MOLEKULÁRIS ÉS  
FUNKCIONÁLIS TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA  
SIKÉRMENTES KÖRNYEZETBEN**

**Zárójelentés**

Oszvald Mária  
**ELTE TTK Növényélettani és Molekuláris Növénybiológia  
Tanszék**

**2012-2016**

## **BEVEZETÉS**

Az OTKA pályázat keretében javaslatot tettünk egy korábbi OTKA (OTKA T-46703) pályázat során kidolgozott modell rendszer felhasználására reológiai kutatásokban, mellyel búza tartalékfehérjék funkcionális tulajdonságait tudjuk tanulmányozni nem búzaliszt alapú háttérben.

A pályázat célja a búza glutenin tartalékfehérjék pontosabb, szélesebb körű megismerése volt. Célunk eléréséhez kísérleteinkben a rizst választottuk, ami olyan sikérmentes környezetet biztosít, ahol az alapliszt fehérjéi nem befolyásolják az eredményeket. Vizsgáltuk a búza sikér kialakulásában résztvevő fehérjék kölcsönhatásait, a búza glutenin alegységfehérjék hatását a rizstészta funkcionális tulajdonságaira *in vitro* rekonstrukciós kísérletekben, illetve a búzafehérjék *in vivo* expressziójával a különböző transzgénikus növényekben. Egy japán kutatócsoport által rendelkezésünkre bocsájtott transzgénikus rizsvonalak keresztezésével új, több HMW glutenin alegységet termelő vonalakat kaptunk, melyek több információt szolgáltathatnak a búza tartalékfehérjék közötti kölcsönhatásokról. A munka során figyelemmel tudtuk kísérni azt is, hogy a búza promóter hogyan szabályozza a gén transzkripcióját a rizs endospermiumban. A transzgénikus rizsnövényben a diszulfidhidak kialakulásához nem szükséges más kölcsönhatás, enzim jelenléte, így megbízható információkat adhatnak.

**A pályázatban vállalt munka szerves folytatása egy korábbi OTKA pályázatban elért eredményeknek. Véleményünk szerint, ez a modell alkalmas arra, hogy a búza tartalékfehérjék tulajdonságainak, a tészta szerkezetére gyakorolt hatásának olyan elemei is vizsgálhatók, melyekre korábban nem volt lehetőség az endogén búzafehérjék hatása miatt. A fehérjék egyes szerkezeti elemeinek a funkcionális tulajdonságokra gyakorolt olyan változásait is képesek lehetünk tanulmányozni, melyek korábban rejtve maradtak.**

**Mivel a rizs fontos a gabona okozta allergiás betegségben szenvedők számára, ezért az új fehérje-összetételű rizs néhány év múlva alternatív élelmiszer alapanyag lehet a prolaminokra is allergiás betegek számára.**

### **1. év**

#### **1. Transzgénikus rizsszemek vizsgálata és új növények létrehozása**

A munka során a korábbi kutatásokból származó HMW Dx5 fehérjét termelő transzgénikus rizs növények magjait használtuk fel kallusz indukcióra (Oszvald és mtsai. 2007). A rizs genetikai transzformációját az éretett embrióból nyert kalluszokból indítottuk.

A transzformációhoz használt rizsnövényből érett magokat sterilizáltuk, majd steril körülmények között N6 kallusz indukáló táptalajra helyeztük. Az N6 indukciós táptalaj 50 mg/ml koncentrációban

hygromicint is tartalmazott biztosítva ezzel, hogy csak a Dx5 fehérjét termelő magokból származó kallusok legyenek transzformálva a *Glu-Dy10* gént tartalmazó konstrukcióval. A transzformációt megelőző napon, a kifejlődött kallusokat az endospermiumról leválasztottuk, majd 24 órán belül bioliztikus módszerrel transzformáltuk.

A transzformálást magát a Jenes és mtsai. által kidolgozott módszer szerint végeztük el a hazai fejlesztésű, szabadalmaztatott GENEBOOSTERT-rel (ELAK Bt, Budapest, MBK, Gödöllő). A génbevitelhez két plazmidot használtunk ko-transzformációban, mert a kísérletek az egy plazmidra történő klónozásra sikertelenek voltak.

A transzformációhoz a 1Dy10 HMW glutenin fehérjealegységfehérjét kódoló gént használtuk a HMW Dx5 endospermium specifikus promóterhez kapcsolva. A terminátor szekvencia (NOS) is a búzából származik. A transzformációban a szelekcióra a pAHC25 plazmidot használtuk, mely a *bar* gén kódoló régióját tartalmazza, herbicid rezisztenciát biztosítva ezzel a kallusoknak, illetve a regenerált növényeknek a sikeres génbeépülés után.

A transzformációhoz a DNS molekulákat aranyrészecskékhez kötöttünk, majd minden célszövetre két lövést adtunk le. A transzformáció után a kallusokat 10 mg/ml koncentrációban foszfinotricint tartalmazó N6SEh táptalajon szelektáltuk, majd a szelekciót túlért kallusokból hajtás- és gyökér regenerációt indukáltunk. A teljesen regenerálódott rizsnövényeket üvegházban neveltük.

### **PCR reakció**

A bejuttatott gének integrációjának bizonyítására első lépésként a feltételezetten transzgenikus növények leveleiből DNS-t izoláltunk az AGS (Aqua Genomic Solution, product No.: 1011, Lot: 03052006) kit felhasználásával. A DNS oldatok koncentrációját 260 nm-en UV spektrofotométerrel határoztuk meg.

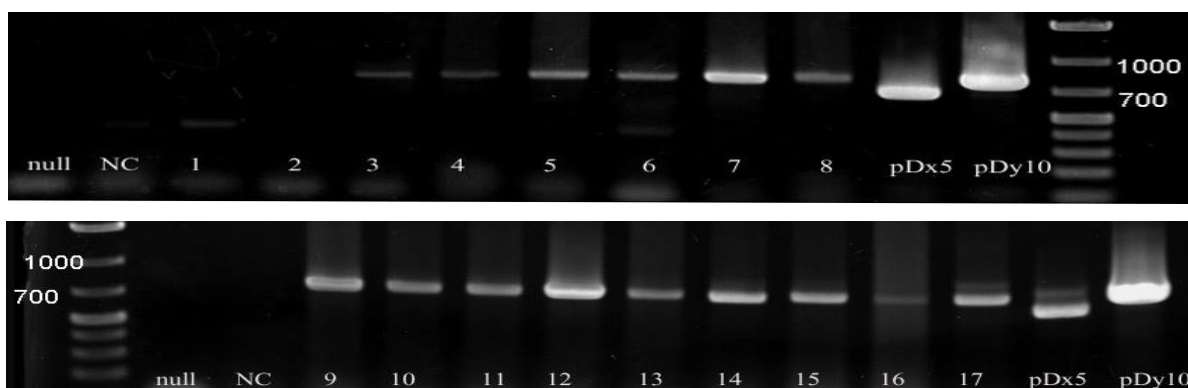
A transzformált gének beépülését PCR reakcióval ellenőriztük. A PCR reakciókhoz a BioRad iCycler Thermal Cycler típusú készülékét használtuk. A PCR reakció után a termékeket 1,5 %-os agaróz gélen futattuk, majd a DNS termékeket etidium-bromiddal megfestve UV fényben analizáltuk. Az izolált növényi DNS-re három különböző PCR reakciót végeztünk. A rizs prolamin génnek, a HMW Dx5 és a HMW Dy10 glutenin fehérjét kódoló génekre specifikus primereket használtunk (1. táblázat).

1. táblázat. PCR reakcióban használt primerek szekvenciája

<b>RIZS PROLAMIN PRIMEREK</b>	
Rp6F	5'-CATCGGCTTAGGTGTAG-3'
Rp6R	5'-ATTGTTGTTGGATTCTACTAC-3'
<b>Búza GLU1 DX5 PRIMEREK</b>	
Prim51	5'-GCC TAG CAA CCT TCA CAATC-3'
Prim52	5'-GAA ACC TGC TGC GGA CAAG-3'
<b>Búza Glu1 Dy10 PRIMEREK</b>	
Dx5pF	5'-AATTTACTTGTTCATGCAG-3'
Dy10p-R	5'-ACCGGCCAACTGTTGGTC-3'

Az irodalom szerint a ko-transzformáció esetén 50% a valószínűsége annak, hogy mind a szelektációs gén, mint a „gene of interest” (GOI) jelen van a genomban. A transzgenikus rizsnövényekre elvégzett PCR reakció alapján 15 független vonalban tudtuk bizonyítani a *Glu-1Dy10* gén jelenlétét. Ebből 10 növényben mind a *Glu-1Dx5* és *Glu-1Dy10* gén bizonyítottan jelen volt (1.ábra).

Ezeket a növényeket további nevelése magfogásig növényházban történt. A felnevelt 15 növényből, melyben mind a *Glu-1Dx5* és *Glu-1Dy10* gén bizonyítottan jelen van, csak 6 független vonalból kaptunk szemtermést. Egy olyan transzgenikus vonallal is rendelkezünk, melyben csak a *Glu-1Dx10* gén van jelen. A magok egy részt visszavettük, hogy megfelelő mennyiségű magunk legyen a további vizsgálatokhoz.



1. ábra: PCR reakció a *Glu1-Dy10* transzgén kimutatására. null: negatív kontrol, NC: negatív növényi kontrol, pDx5: a transzformációhoz használt bakteriális Dx5 plazmid, pDy10: a transzformációhoz használt bakteriális Dy10 plazmid. 1-17. Transzgenikus rizsvonalak.

### 'Myc' szekvenciával jelölt *Glu-1Dy10* gén konstrukció előállítás

A *Glu-1Dy10*-et tartalmazó plazmid kotranszformációjával párhuzamosan egy 'myc' szekvenciával jelölt *Glu-1Dy10* gént tartalmazó konstrukció előállításán is dolgoztunk. A konstrukcióban a *Glu-1Dy10* génhez kapcsoltuk a 'myc' szekvenciákat. A transzgén-tag fúziós gén a Dx5 endospermium

specifikus promotor szabályozása alatt áll. A konstrukció építés következő lépése a *bar* szelektációs gén beépítése volt lehetővé téve ezzel az egy plazmiddal történő transzformáció.

Az így elkészített konstrukció alkalmas rizs transzformálására *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette módszerrel és génpuskával is. A fehérje 'myc' szekvenciákkal való megjelölése lehetővé teszi, hogy az így létrehozott transzgenikus növények endospermiumában nyomon kövessük ezeknek a fehérjéknek a lokalizációját, illetve a fehérjék vándorlását. Az endospermiumból készített metszetek specifikus antitesttel jelölve fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgálhatók. Ezáltal többet megtudhatunk a búza tartalékfehérjéknek a rizs endospermiumban történő viselkedéséről, önmagukkal vagy más fehérjékkel történő kölcsönhatásukról.

A konstrukció a pályázat végére el is készült, azonban a transzgenikus rizsvonalakat még nem sikerült előállítani.

## **2. Búza glutenin alegységfehérjéket termelő rizsvonalak keresztezése**

A pályázatban megfogalmazott célok között szerepelt a nemzetközi együttműködés keretében a japán kutatócsoport által rendelkezésükre bocsátott búza LMW és HMW By9 fehérjét egyénileg, illetve együttesen termelő transzgenikus rizsmagok felsokszorosítása (Etsuko és mtsai.2008), majd keresztezése a mi búza Dx5 HMW fehérjét termelő transzgenikus rizsvonalunkkal (Oszvald és mtsai. 2007).

A Japánból kapott rizsmagokat elültettük magszaporítás céljából. A növénynevelés során azonban nehézségeink akadtak, a japán Nipponbare transzgenikus rizsfajták egy része nem volt fertilis (ki sem kelt), a másik része pedig nem hozott virágot, ami elkerülhetetlenül szükséges a keresztezéshez. Ezután hosszú, több kudarccal teli küzdelem kezdődött a magok felszaporítására. Több lépésben próbáltuk optimalizálni a nevelési körülményeket és megfejteni az okát annak, hogy miért nem voltunk képesek megfelelő mennyiségű maghozam eléréséhez. Miután a kontroll növények sem hozták a tőlük elvárt maghozamot, a cserépen-földben történő növénynevelésről a folyadék kultúrában történő nevelésre tértünk át. A negyedik év végére sikerült ezt a problémát megoldani, és a csíráztatott magokból kikelt növények végül bugát és termést hoztak.

A keresztezési kísérletekben Jancsó Mihály (HAKI, Szarvas) volt segítségünkre. A rizsmagokból virágzásig növényt neveltünk.

A növényeket izolált körülmények között neveltük fel. Az egyes növények virágzási idejét, a tapasztalt fotoperiodikus érzékenység miatt a nappalhossz csökkentésével szinkronizáltuk. A virágzás megkezdésekor, amikor a legfelső virágok kinyíltak, a bugák legfelső harmadát eltávolítottuk, hogy elkerüljük az öntermékenyülést. Ezután a virágzatot az egyes bugaágak virágainak szelektált eltávolításával kiritkítottuk. A kasztráláshoz a pelyvalevelek felső harmadát

levágtuk - ügyelve arra, hogy a portokok ne sérüljenek meg. A portokok eltávolításához csipeszt és vákuum kasztrálót használtunk (a Cornell Egyetem és a Nemzetközi Rizskutató Intézet módszere alapján). Az így előkészített virágokat csipesszel vagy a virágzó bugák pörgetésével megporoztuk a kívánt keresztezési kombinációknak megfelelően. A bugákat ezután izoláltuk, majd az érés után a sikeresen termékenyült szemeket begyűjtöttük.

Eredmény: többszöri keresztezési kísérlet után a HMW Dx5 GS fehérjét és a HMW By9-et termelő transzgenikus rizsek kereszteztük sikeresen. Ezen növények T0 magvaival rendelkezünk, melyeket további kísérletekben szeretnénk volna felhasználni. Idő hiányában azonban ezek nem történtek meg.

### **3. Búza tartalékfehérje alegységek inkorporációja rizs- és búzalisztbe**

A riztésztára kidolgozott re-oxidációs technika segítségével a búza glutenin alegységfehérjéknek a riztészta reológiai tulajdonságaira gyakorolt hatását inkorporáció kísérletekkel vizsgáltuk. Az egyéni HMW glutenin alegységek hatásának a vizsgálatára, nemesített, csak egy adott típusú HMW glutenin alegységet termelő búzafajtából izoláltunk fehérjéket. Ezek a fajták a Galahad -6, Galahad-7 és Galahad-8 nevet viselik (Payne és Seekings, 1996). Az egyes fajták a búza B kromoszóma hosszú karján kódolt Bx6 és 7, illetve a rövid karon kódolt By8 HMW glutenin alegységeket termelik.

#### *Egyéni HMW glutenin alegységfehérjék tisztítása búzalisztből*

A Galahad-6, Galahad-7 és Galahad-8 búzalisztből nagy mennyiségben tisztítottunk Bx6, Bx7 és By8 típusú HMW glutenin alegységfehérjéket (Capocchi és mtsai. 1999). A fehérje izolátumokat különböző arányban rizs- és búzaliszt fehérjéi közé építettünk be egy korábban kidolgozott módszer segítségével (Oszvald és mtsai. 2009). Az dagasztási kísérleteket a micro z-arm mixer egy prototípusával végeztük (Dr. Tömösközi Sándor laboratóriumában, BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tsz.). A beépített fehérje mennyisége az előzetesen megállapított teljes rizs - és búzaliszt fehérje mennyiségének a 10%-a volt.

A kísérletek során felhasznált búza HMW glutenin alegységfehérjék tisztítását 30-30g Galahad6, Galahad7 és Galahad8 lisztből kiindulva állítottuk elő (Oszvald és mtsai. 2013). Az izolált frakciók összetételét SDS gélelektroforézissel ellenőriztük.

#### *LMW glutenin alegységfehérjék bakteriális expressziója*

Az LMW glutenin alegységfehérjék bakteriális expresszióját és tisztítását a Dowd C és Bekes F (2002) által publikált módszer alapján végeztük el. A vizsgálni kívánt fehérjét kódoló expressziós vektort elektroporációval *E. Coli* kompetens sejtbe transzformáltuk. A baktériumok felszaporítása és

indukcióját követően a termelt fehérjét több lépésben tisztítottuk, majd dializáltuk. A dialízis után a centrifugálással összegyűjtött fehérjét fagyaszttva szárítottuk.

### **Tisztított fehérjék inkorporálása**

Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy a mikro z-arm mixer rizslisztre történő alkalmazása lehetővé teszi a fehérje-összetétel módosítása után létrejövő változások követését (Oszvald és mtsai. 2009). Így ez a módszer alkalmas lehet további tézta rekonstrukciós vizsgálatok elvégzésére, illetve a transzgénikus rizslisztekben bekövetkező változások vizsgálatára is.

A búza glutenin alegységek hatását mind a búza mind a rizstészta funkcionális tulajdonságaira az alegységek polimerbe történő beépítésével vizsgáltuk. Az alegységek beépítéséhez rizs esetében egy, az Oszvald és mtsai. (2009) által rizsre kidolgozott módszert használtunk, amely a fehérjék diszulfidkötéseit megbontó, majd a kötéseket felépítő redukciós/oxidációs folyamat optimalizálásán alapul. A búza esetében pedig Békés és mtsai. (1994) által kidolgozott és alkalmazott inkorporációs módszerrel építettük be az egyéni HMW és a bakteriólisan expresszált LMW glutenin alegységfehérjéket.

A mérést megelőzően a fehérjetartalomnak 10%-ában a tisztított fehérje alegységeket a rizs- illetve a búzaliszttel homogenizáltuk. A liszt és a hozzákevert búzafehérje alegységeket, egy redukciós majd egy oxidációs lépésben a diszulfidhidak összekötésével beépítettük őket a rizs és a búzafehérje polimer szerkezetébe.

Az x és y típusú fehérje alegységek arányát a következő módon változtattuk (x:y) 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 0:100, majd vizsgáltuk a hatását a rizs- és búzátészta dagasztási tulajdonságaira:

### *Tartalékfehérjék SE-HPLC vizsgálata*

A téztták fehérje molekulaméret eloszlását méretkizárásos folyadék kromatográfia (SE-HPLC) segítségével vizsgáltuk mind az oldható mind az oldhatatlan fehérjefrakciókban. A fehérje extraktumok „frakcióinak” kromatogramján általánosságban négy csúcsot különítettünk el (Oszvald és mtsai 2008). Feltételezéseink szerint ezek az első frakciók tartalmazzák a nagy molekulatömegű  $\alpha$  és  $\beta$  glutelin alegység-fehérjék különböző mértékben oligomerizálódott termékeit, vagyis trimer- dimer- és monomer fehérjék, amelyekben a 151 kDa, illetve 105 kDa molekulásúlyú monomerek inter-molekuláris diszulfidhidak révén kapcsolódnak össze. Az utolsó (negyedik) frakció kisebb polipeptidek, albuminok, monomer globulinok és prolaminok keveréke.

A kromatogramok csúcsainak görbe alatti területéből megállapítottuk az oldhatatlan polimer fehérjék arányát jellemző úgynevezett UPP% értékét is (Oszvald és mtsai. 2008).

### ***A búzafehérjék hatása a rizs és a búzátészta dagasztási paraméterekre***

Tisztított Bx6, Bx7 és By8 HMW-GS fehérje alegységeket építettünk be 4 g lisztből készített búza és rizstésztaiba a lisztek teljes fehérjetartalmának 10%-ban, majd tanulmányoztuk ezen fehérjék hatását a rizstészta és a búzátészta dagasztási paramétereire. A következő dagasztási paramétereket vizsgáltuk: a tészta kialakulási idő (dough development time- DDT), a tészta stabilitása (stability-ST) és az ellenállás rezisztenciája (resistance breakdown-BD). A rizs- és a búzátészta dagasztási görbéje jelentősen különbözik egymástól, feltehetően a két liszt fehérjéinek eltérő hidratációs tulajdonságai következtében. A búza prolamin fehérjék inkorporációja változást eredményezett a tészták dagasztási paramétereiben és a görbék jellegében is.

Valamennyi tészta rekonstrukciós kísérletben azt tapasztaltuk, hogy az egyéni (x és y típusú) HMW fehérje kombinációk szignifikánsan pozitív hatást mutattak mind a rizs-, mind a búzátészta reológiai paramétereire. A tészta kialakulási idő és a stabilitás növekedett, míg a tészta ellenállás csökkent a hozzáadott fehérjék hatására. A HMW-GS fehérjék valamennyi esetben növelték a nagyméretű polimer fehérjék mennyiségét is a tésztában, ami stabilabb tésztát eredményezett a kontrol (kezeletlenhez) képest.

A tészta kialakulási idő (DDT) a maximális konzisztencia eléréséhez akkor növekedett a legjobban a rizs esetében (32%), amikor a Bx7 és a By8 fehérjék aránya 1:1 volt. Az y típusú fehérjék mennyiségének növelése csökkentette a rizstészta DDT értékét. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a Bx6+By8 HMW-GS párok esetében is. Az x és y típusú fehérjék inkorporációjának pozitív hatása volt az ellágyulás mértékére (DB) is. A legnagyobb hatás a DB értékre a Bx7+By8 fehérjék 1:1 arányú beépítése esetén volt megfigyelhető.

Ellentétben a rizstésztaival, az inkorporáció hasonló, de jelentősen eltérő hatása volt megfigyelhető a búzátészta dagasztási paramétereire az Bx6, Bx7 és By8 alegységfehérjék beépítése során. A DDT értéke folyamatosan növekedett Bx7 alegységek mennyiségének növelésével, majd elért egy plató értéket. Szintén szignifikáns hatás volt megfigyelhető a többi paraméter változásában is. A BD érték egyhangúan csökkent az x típusú alegységek beépítésével, illetve a tészták megnövekedett stabilitást mutattak mindkét HMW pár estében.

Az x+y típusú HMW-GS fehérjepárokat bakteriálisan expresszált LMW-GS fehérjékkel együtt is vizsgáltuk rizs- és búzátészta rekonstrukciós kísérletekben. A beépített egyéni búza HMW és LMW-GS tartalékfehérjék a rizstésztaiban kialakuló polimer fehérjék mennyiségére és a rizstészta dagasztási tulajdonságaira akkor voltak a legnagyobb hatással, amikor a Bx és By típusú fehérjék 1:1, a HMW és LMW glutenin alegységfehérjék 1:3 arányban építettük be. A dagasztási paraméterekben bekövetkező változások maximum illetve minimum jelleget mutattak. A rizstésztaival ellentétben a búzátészta dagasztási paraméterei (DDT, ST) az LMW alegységfehérjék



mennyiségének növelésével monoton csökkenést mutattak, míg a tészta ellágyulása monotonon növekedett.

Az inkorporáció után vizsgáltuk és jellemeztük a tésztaiban létrejövő fehérje mátrixot (polimer fehérjék mennyisége és aránya). A SE-HPLC mérésekkel meghatároztuk a molekulaméret eloszlás, a polimer méret (a fehérje mátrixban) és a funkcionális tulajdonságok közötti kapcsolatot a búzafehérje alegységek rizs- és búzalisztbe történő beépítése után. A kromatogramok kiértékelése azt mutatta, hogy az újonnan beépített fehérje hatással volt a fehérjék molekulaméret eloszlására is a tésztaiban. A fehérjék aránya a nagyobb molekulaméret irányába tolódtak el.

A búza glutenin alegységfehérjék beépítésének következtében az SE-HPLC kromatogramokból számolt UPP%, azaz oldhatatlan polimerek százalékos aránya szignifikánsan növekedett a kontrol tésztaikhoz képest mind a rizs, mind a búza minták esetében. Az UPP% értéke a búza esetében a beépített x típusú alegységek mennyiségének növekedésével egyenletesen növekedett és egy platót ért el. Ezzel szemben a rizs esetében az ugyanolyan arányú és mennyiségű HMW x-y beépítés egy maximális görbét eredményezett, ahol az UPP% az 50:50%-os inkorporáció esetében érte el a maximális értéket. A továbbiakban hozzáadott LMW fehérjék mennyiségének növelésével a számított UPP% értéke szignifikánsan monotonon csökkent a búzalisztben, míg a rizs esetében egy maximum jellegű görbét kaptunk, melynek maximuma az 1:3 arányú HMW:LMW fehérje beépítésnél volt. Ezzel azt tudtuk bizonyítani, hogy a lisztekhez kevert búza fehérjék beépültek az alaplisztek fehérje mátrixába, megváltoztatva ezzel a polimerek méretét.

Az ezzel szemben az UPP% értéke búzateészta rekonstrukciós kísérletekben egyhangúan növekedett egy felsőérték elérésével az Bx alegységek inkorporálása után

**A legfontosabb megállapításunk, hogy míg a rizs esetében a fehérjék beépítése szinergikus hatással volt a rizstészta dagasztási paramétereire, addig fehérjék ugyanilyen arányú beépítése a búzaliszt fehérje mátrixába nem mutatott szinergikus hatást. Szinergikus hatást korábban a búza alapliszt esetében csak a D kromoszómán kódolt fehérje párok (Dx+Dy) esetében figyeltek meg, míg Bx és By fehérjékre még nem. Így a búza glutenin fehérjék olyan tulajdonságait is megfigyelhettük, melyekre korábban nem volt lehetőség. A kísérlet részletes eredményei az Oszvald és mtsai. 2013 publikációban olvasható.**

## 2. év

**A (Dx5 és Dy10) transzgén hordozó rizsnövények jellemzése. A transzkripció mintázat vizsgálata.**

Ebben az évben a meglévő transzgenikus növényeink endospermiában termelődő búza fehérje gének transzkripció időbeni változását követtük nyomon.

A japán kutatók által rendelkezésünkre bocsátott 3 transzgenikus vonal (LMW-GS, 1By9-HMW-GS) bugájából mRNS-t nyertünk ki a transzgének expressziójának nyomon követésére a virágzást követő 8.,12.,16.,19.,22., 28. napokon

### **Real Time PCR (qRT-PCR)**

A transzgének expresszióját változását kvantitatív real-time PCR segítségével követtük nyomon a szemtermés fejlődése során. Az expresszió szintjét a szakirodalom alapján legstabilabbnak mutakozó 2 belső kontroll génhez hasonlítva (Jain és mtsai 2006) vizsgáltuk. A transzgenikus rizs növények közül két vonalat vizsgáltunk az RT-PCR-rel.

A genetikailag módosított rizs vonalakban kvantitatív RT-PCR segítségével vizsgáltuk a 2 transzgén (LMW és HMW) expresszióját a virágzást követő 8., 12., 16., 19., 22., és 28. napon. Ehhez először mágnesgyöngyös módszerrel össz mRNS-t nyertünk ki, mintánként 3-3 fejlődő szemtermésből, majd átírtuk teljes cDNS könyvtárrá. A cDNS ellenőrzése és a PCR reakciók optimalizálása után a transzkriptum mennyiségét kvantitatív RT-PCR segítségével SYBR technikával mértük. Az kapott fluoreszcencia eredményeket Pfaffl-módszerrel értékeltük.

### **mRNS kinyerés és cDNS könyvtárkészítés**

Az mRNS kinyerést 3 db, folyékony N<sub>2</sub> segítségével homogenizált fejlődő szemtermésből GenoVision mRNA Isolation Kit-tel végeztük a gyártó előírásainak megfelelően. A DNáz-kezelés eredményességét PCR reakcióval igazoltuk, a RUBC rizs ubiquitin konjugáz enzim génjére tervezett primereket használva. A kinyert össz-mRNS-t a DNáz-kezelést követően azonnal cDNS-sé írtuk át. A reverz transzkripciót a RUBC primerpárral PCR reakcióval ellenőriztük

### **PCR reakciók**

A cDNS könyvtár épségének ellenőrzését és real-time PCR reakciók optimalizálását hagyományos PCR segítségével végeztük. A primereket a megfelelő gének 3' végére terveztük; a másodlagos szerkezetet, ill. a kapcsolási hőmérsékleteket az OligoAnalyzer internetes szoftver segítségével ellenőriztük (2. Táblázat).

Az PCR reakciók végtérfogata 10 µl volt. A reakció összetétele 1 unit Taq polimeráz, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1/10 térfogat Taq puffer, 0,5 µM primer, 10 ng templát DNS 10 µl végtérfogatban. A reakcióhoz ICycler™ BIO-RAD készüléket használtunk. A PCR programja: 5 perc 95°C kezdeti denaturáció, 36 (reakció optimalizálás estén 27) ciklusban 15 sec 95°C denaturáció, 20 sec kapcsolás, 20 sec 72°C lánchosszabbítás, majd 1 perc 72°C végső lánchosszabbítás.

## 2. Táblázat: Alkalmazott specifikus primerek a real time PCR reakciók optimalizálásához

név	szekvencia	accession Nr.	cél
ReEF1a-F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	AK061464	Belső kontroll gén: Rizs eukarióta elongációs faktor 1 $\alpha$
ReEF1a-R	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA		
RUBC-F	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA	AK059694	Belső kontroll gén: Rizs ubikvitin konjugáz
RUBC-R	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG		
HMW-F	TCTCCACAACAGTCGGGAC	X12928	Búza By9 típusú HMW glutenin
HMW-R	TTGTCCTGGATGTCCTTGTC		
LMW-F	ATCCCGCCATGAGTCAATC	TAU86030	Búza m- típusú LMW glutenin
LMW-R	ATCCCGCCATGAGTCAATC		
RPDI-F1	GCTACAATCTTGGATGAGGC	AY987391	Rizs diszulfid izomeráz enzim
RPDI-F3	TGTACAAGGTTACCCACC		
RPDI-R	ATCTCGTCGGCTGTCCTGC		

### qPCR mérések

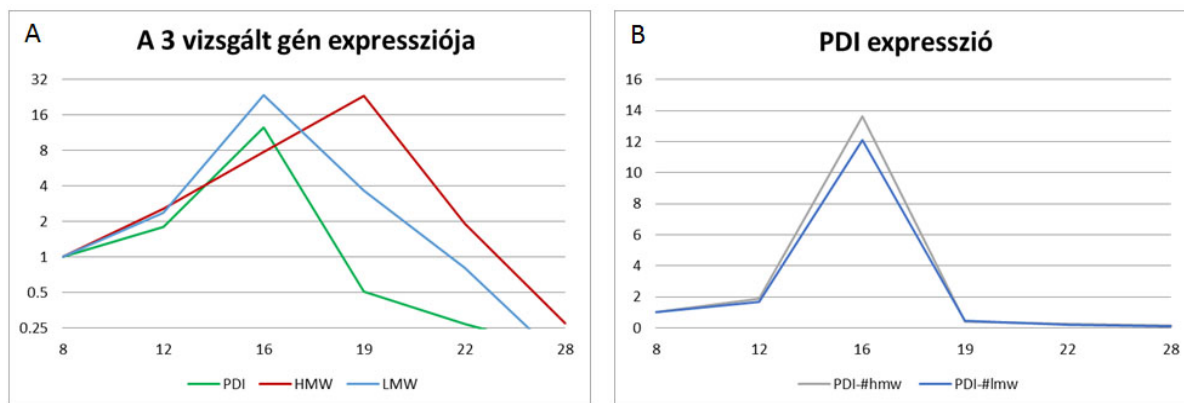
A qPCR esszék kivitelezéséhez Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific) és Applied Biosystems StepOne™ Plus Real-Time készüléket és a StepOne™ v.2.2.2 szoftvert használtunk. A mért adatok kiértékeléséhez két szakirodalom alapján választott referencia gént (Jain és mtsai. 2006; Jain, 2009; Li és mtsai. 2010) és a reakcióhatékonyságokat is figyelembe vevő Pfaffl-módszert alkalmaztuk.

### Transzgének megjelenése a szemfejlődés során

A génmódosított rizsvonalak a glutenin alegységfehérjéket kódoló transzgént saját endospermium specifikus promotérükkel és egyéb transzkripciós szekvenciáikkal együtt tartalmazzák (Liu és mtsai.. 2000; Araki és mtsai. 2008). Bár korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a búza tartalékfehérjék promoterei más növényekben is szigorúan endospermium-specifikusan expresszálnak, részletesen vizsgáltuk a transzgének expresziós szintjét a virágzást követően a termésfejlődés és a termésérés során az endospermiumban.

A hat mintavételezési időpontban 6 mintából (három HMW- By9 és három LMW-GS termelő transzgenikus rizsvonal) számított génexpressziós értékeket a 2A. ábra mutatja.

A többi mintától való jelentős eltérése miatt a mindkét glutenin alegységfehérjéket (LMW+ HMW) termelő vonallal a továbbiakban nem foglalkoztunk, és a további elemzésekbe nem vontuk be.



2. ábra: A: A HMW és LMW gnek valamint a PDI enzim génexpressziója a vizsgált transzgenikus rizsvonalakban a virágzást követő különböző időpontokban. (8, 12, 16, 19, 22, 28 nap). B: PDI enzim gén expressziós szintje a HMW és LMW GS fehérjéket termelő transzgenikus vonalakban

A búza glutenin fehérjék transzkripció mintázatára korábban, a búza endospermiumban elvégzett kísérletekben azt találtak, hogy a HMW GS fehérjék expressziója alacsony volt az első néhány napban, majd a 10 nappal a virágzás után az expresszió szintje jelentősen megemelkedett. A virágzás utáni 17-21 napon a fehérjék transzkripciója ismét alul szabályozott volt.

Az általunk elvégzett qPCR eredményei azt mutatják, hogy mind a kis-, mind a nagy molekulásúlyú glutenin alegység esetén elmondható, hogy expressziójuk szintje intenzíven növekszik a rizs szemtermés fejlődés során. Az génexpresszió szintje nagyjából a virágzást követő 22. naptól csökken, de még a 28. napon is magasabb értéket mutat, mint a referenciagénként használt háztartási géneké.

A nagy molekulásúlyú glutenin alegység (HMW-GS) expressziós szintjének maximumát a virágzást követő 16-19 nap közt éri el a transzgenikus rizsek endospermiumában. Míg a kis molekulásúlyú glutenin alegység (LMW-GS) ennél korábban, ennek szintje már a 19. napon alacsonyabb, mint a 16. napon (2A. ábra).

A búza prolamin fehérjék transzgenikus rizsben történő transzkripció vizsgálata hasonló képet mutatott, mint azt a búzában megfigyelték. A búza promóterek tehát a rizsben is hasonlóan szabályozzák a gén expressziót mint a búzában. A búza tartalékfehérjék ugyanúgy szerepet játszanak a rizs endospermium feltöltésében az érés során. Mivel transzkripciójuk hasonló, mint a búzában, ez is bizonyítja annak lehetőségét, hogy egy idegen környezetben vizsgáljuk őket.

### **PDI expresszió a szemfejlődés során**

Korábbi munkánk során azt tapasztaltuk, hogy egy nagy molekulásúlyú búza glutenin (Dx5) tartalmazó génmódosított rizsvonalban az érett szemtermésben megemelkedik a protein diszulfid-izomeráz (PDI) fehérje mennyisége (Oszvald és mtsai 2013).

Feltételezhetően a megnövekedett PDI enzim szint pedig hatással van a tartalékfehérjék polimerizációjára a transzgenikus rizsben. Ezért a PDI fehérjék áttétesen hatással lehetnek a rizsliszt sütőipari minőségére. Korábban a PDI enzim pozitív hatását figyelték meg a búzatészta dagasztási tulajdonságaira olyan *in vitro* kísérletekben, ahol búza glutenin alegységfehérjéket inkorporáltak a tészta (Cnadler és mtsai. 1996).

Továbbá azt is feltételezhetjük, hogy a megnövekedett PDI enzim szintje a mi HMW-GS alegységet termelő transzgenikus rizs vonalainkban részben felelős lehet a megváltozott fehérje eloszlásért is, illetve a megnövekedett polimer fehérjék arányáért. A rizs prolamin és globulin fehérjék, melyek a monomer formában vannak jelen a vad típusban, a polimer fehérjék részét képezik a transzgenikusban (Oszvald és mtsai. 2013).

A rendelkezésünkre álló két transzgenikus vonalban (HMW-By9 és LMW-GS) ezért vizsgáltuk a PDI expressziós szintjét is mRNS szinten. Bár szakirodalmi adatok szerint nincs szükség a PDI jelenlétére a búza glutenin polimerek kialakulásához (Shewry & Tatham, 1997) elképzelhető, hogy az ER-ben megjelenő jelentős mennyiségű diszulfid-híd visszahat a PDI fehérje expressziójára.

A génexpressziós vizsgálatokból az látszik, hogy bár a glutenin gének expressziója nagyobb értéket mutat a virágzást követő 12. napon, ezek később érik el az expresszió csúcsát, illetve szintjük is később kezd el csökkenni, mint a PDI mRNS szint. Ezért nem valószínű, hogy a nagy mennyiségű rekombináns transzkriptum inicializálná a PDI expressziót a virágzást követő időszakban. Ez összhangban van a búza esetén leírtakkal, ahol szintén megelőzi a PDI expressziós csúcsa a tartalékfehérjékét. Grimwade és munkatársai (1996) mRNS szintű vizsgálatokat végeztek búzában, ahol a DPI expresszió csúcsát a virágzást követő 14. napon figyelték meg. Fehérjeoldali vizsgálatokban a PDI fehérjemennyiségének csúcsa a virágzást követő 17. napon volt megfigyelhető, míg a tartalékfehérjék jellemzően a 14-28 nap között mutatnak expressziós csúcsot (Shimoni et al., 1995).

Bár expressziós profiljukat tekintve a PDI és LMW gének korrelálnak, míg a HMW tőlük eltérő lefutást mutat, külön megvizsgálva a HMW-t és LMW-t expresszáló vonalakat azt tapasztaljuk, hogy a HMW-t expresszáló vonalakban nem szignifikánsan, de magasabb expressziós érték mérhető (2A ábra). A PDI fehérje génexpressziós profilja csaknem ugyanazt a képet mutatta az HMW és az LMW-GS fehérjéket termelő transzgenikus rizsmintákban (2B ábra).

A mag tartalékfehérjék megfelelő szerkezetének kialakulása a PDI fehérje által szabályozott. Ezért logikus a PDI fehérje expressziójának az összekapcsolása a glutenin fehérjék termelődésével. A búzában azt figyelték meg, hogy a PDI gén expressziója már a tartalékfehérjék endospermiumban való megjelenése előtt megkezdődik. A PDI korábbi transzkripciója megkönnyíti a PDI fehérje

termelődését, ami segít a HMW glutenin alegységfehérjék felhalmozódásában és a sikér polimer fehérjének kialakításában a magfejlődés során. A *PDLL* gének expressziója a magfejlődés középső szakaszában a legintenzívebb, ami növeli az intermolekuláris diszulfid hidak kialakításának lehetőségét a mag későbbi fejlődési fázisában. Ez az elmélet alátámasztja a nagy polimer fehérjék drasztikus növekedését és stabilizálódását az átrendezett vagy formálódott intra-molekuláris diszulfid kötések által.

### **A transzgenikus rizsvonalak szemtermésének vizsgálata fehérje oldalról (SDS-PAGE, western blot analízis)**

Az előző évben elvégzett transzformációt követően, a HMW Dx5 glutenin fehérje alegységeket expresszáló transzgenikus növények *Glu-1Dy10* génnel történő újra transzformálásának sikerességét specifikus primereket alkalmazó PCR –rel bizonyítottuk.

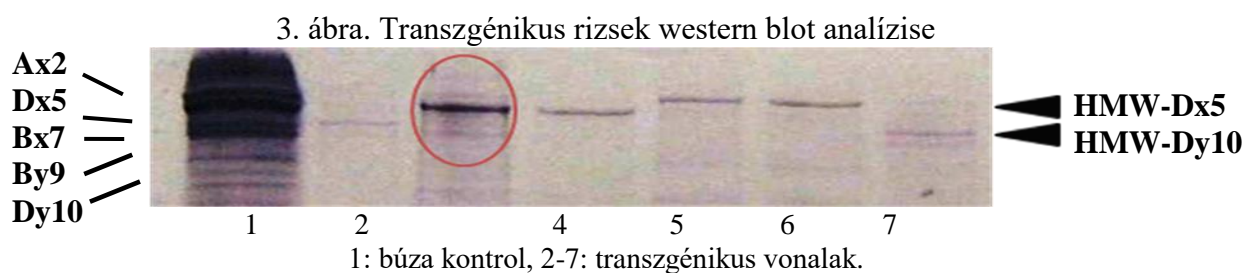
Ebben az évben a fehérje expressziót is vizsgáltuk a transzgenikus rizsvonalak endospermiumában. Ehhez a magok endospermiumából fehérjét nyertünk ki. A felnevelt 10 növényből, melyben mind a *Glu-1Dx5* és *Glu-1Dy10* gén bizonyítottan jelen van, csak 3 független vonalból kaptunk szemtermést. Ezen vonalak magjából fehérjét nyertünk ki a fent említett módszerrel. A kapott fehérjét redukáló SDS akrilamid gélen elválasztottuk (Leammler és mtsai. 1970) és Western blot analízissel kimutattuk a transzgénről termelődött búza HMW glutenin tartalékfehérjét.

#### *Western blot analízis*

A transzgenikus rizs növények HMW-Dx5 és Dy10 glutenin alegység fehérje expresszióját western blot analízissel is vizsgáltuk. Első lépésben a transzgenikus növények endospermiumából kinyert fehérjéket SDS-PAGE –segítségével elválasztottuk, majd a fehérjéket egy nitrocellulóz (PVDF) membránra transzferáltuk. A szűrőpapírok között elhelyezett membránt és az akrilamid gélt tartalmazó „szendvicsben” a fehérjéket BioRAD Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell készülékben 130 mA állandó áramerősségen 15 percig „Towbein” puffer segítségével transzferáltuk.

A membránt blokkolás után először a HMW fehérjékre specifikus antitesttel (HMW-R2) (Denery-Papini és mtsai. 1996), majd másodlagos (nyúl) antitesttel kezeltük. A membránt NBP/BCPI szubsztrát és enzim kombinációjával történő kezelés után a színesen megjelenő sávokat analizáltuk (3.ábra).

Az alkalmazott elsődleges antitest (HMW-R2) specifikus valamennyi HMW glutenin fehérjére, így a membránon a kettősen transzformált rizsmagok esetében két sáv megjelenését vártuk. Egy sávot mely megfelel a búza HMW Dx5 (85 kDa) és egyet, ami a búza HMW Dy10 (68 kDa) alegységfehérje méretének.

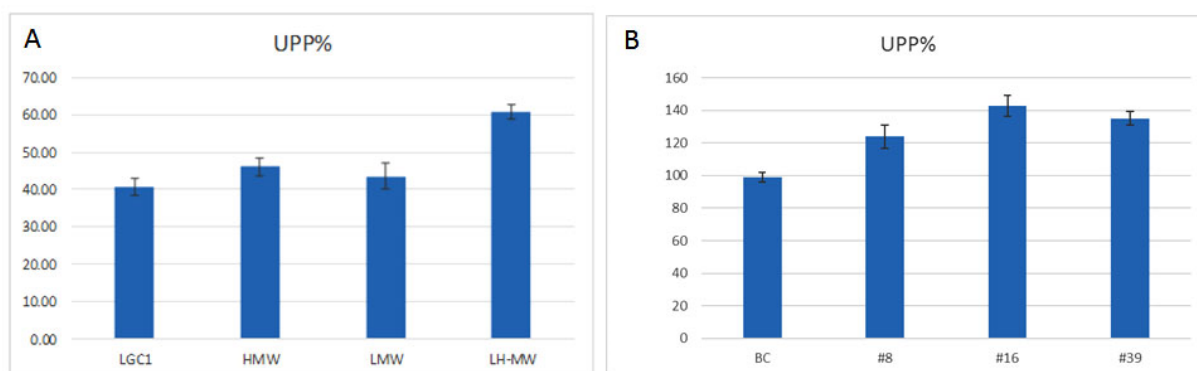


Az antigén-antitest reakció következtében a membránon megjelent sávok a fehérje expressziót igazolták. A vizsgált vonalak közül egy vonalban bizonyítottuk mind a két HMW-GS fehérje expresszióját (3. árba #3). A csak *Glu-1Dy10* transzgén tartalmazó vonalunkban a HMW Dy10 alegységfehérje jelenlétét is sikerült kimutatnunk (#7).

Sajnos a kevés maghozam miatt, ezekből a növényekből sem tudtunk a későbbiekben reológiai kísérleteket elvégezni.

#### Tartalékfehérjék SE-HPLC vizsgálata transzgénikus rizsvonalakban

A fehérjék molekulaméret eloszlását, illetve a transzgénikus rizsvonalakban expresszált búza tartalékfehérjék hatását a polimer fehérjék arányára a rizslisztekben SE-HPLC analízissel vizsgáltuk. A fehérjéket a már fent említett módon extraháltuk a transzgénikus rizsmagokból. Az oldhatatlan polimer fehérjék mennyiségét (UPP%) a 4. ábra mutatja.



4. árba: A: UPP% értéke a HMW GS By9 és LMW GS fehérjéket expresszáló transzgénikus rizsvonalakban. LGC1: nem transzformált Nipponbare, HWM: By9 alegységet tartalmazó, LMW: LMW-GS fehérjét expresszáló, LH-MW, mind a By9 és LMW-GS fehérjét termelő transzgénikus rizsvonalak. B: UPP% értéke a HMW GS Dx5 és/vagy HMW GS Dy10 fehérjéket expresszáló transzgénikus rizsvonalakban a kontrolhoz viszonyított (=100%) százalékos arányban. BC: transzformáción átesett, negatív kontrol. #8, #16 és #39 transzgénikus rizsvonalak.

A UPP% értéke valamennyi vizsgált általunk előállított transzgénikus rizsvonalban a kontrolhoz viszonyítva szignifikánsan nőtt (4B ábra). Ez azt jelenti, hogy a polimer fehérjék aránya ezekben a vonalakban megnövekedett a nem transzgénikus mintákhoz képest. Feltételezzük, hogy a búza

fehérjék beépültek a rizsfehérjék polimer mátrixába növelve ezzel a polimer fehérjék mennyiségét. Ebből kifolyólag, bár megfelelő mennyiségű mag hiányában a dagasztási kísérleteket nem tudtuk elvégezni, de feltételezhetjük, hogy ez a fehérje kombináció (Dx5+Dy10) szintén pozitív hatással van a rizstészta dagasztási paramétereire. Habár az UPP% értékek arra a kérdésre nem adnak választ, hogy vajon ezek a fehérje alegységek önmagukkal formálnak hosszú polimer láncokat, vagy a rizsfehérjék polimerizálódásra alkalmas alegységeivel lépnek kapcsolatba. Ennek a kérdésnek a megválaszolása további kísérleteket igényel.

Az általunk előállított transzgénikus rizsvonalak mellett a japán kutató csoporttól kapott HMW-GS By9, LMW-GS, illetve HMW-By9 és LMW-GS alegységfehérjéket termelő rizsmagok endosperimiumának fehérje eloszlását is megvizsgáltuk SE-HPLC segítségével (4A ábra).

A transzgénikus vonalak UPP% -ának értéke ebben az esetben is jelentős eltérést mutatott a kontrolhoz képest. A legnagyobb változást (csaknem 20%-os eltérést) az LH-HMW, azaz a két transzgénikus vonalak (By9 és LMW-GS) keresztesése után kapott rizsvonalakban tapasztaltuk. Ez nem meglepő, hiszen a glutenin fehérje alegységek ezekben a vonalakban fordulnak elő a legnagyobb mennyiségben. Az UPP% értékek azt bizonyítják, hogy a búza fehérjék expressziója a rizsek endosperimiumában hatással volt a rizs fehérje összetételére, és a nagyobb molekulaméretű fehérjék mennyiségének irányába változtatta meg annak összetételét.

A kromatogramok kiértékelése azt mutatta, hogy a fehérjék aránya a nagyobb molekulaméret irányába tolódtak el mind az oldható, mind az oldhatatlan frakciókban a kontrol, azaz a nem transzformált mintához viszonyítva.

Az SE-HPLC kísérletek tehát azt bizonyítják, hogy az expresszált búza fehérjék részei az alaplisztek fehérje mátrixának. Annak bizonyítására, hogy az így létrejött polimerek a búza fehérje alegységek polimerizálódásával, avagy a rizs fehérjékkel kölcsönhatást kialakítva jönnek létre, erőfeszítéseket tettünk nemzetközi együttműködésben történő vizsgálatra.

Valamennyi transzgénikus vonalból fehérjét izoláltunk az Oszvald és mtsai. (2013) alapján, majd eljuttattuk a Murdoch University-re Prof Wujun Ma laboratóriumába (Perth, Ausztrália), MALDI-TOF elemzésre. Wujun Ma a 12. Gluten Workshop-on Pekingben (2012) tartott előadásán arról beszélt, hogy MALDI-TOF segítségével képesek voltak megállapítani az aktív cisztein aminosavak számát glutenin alegységfehérjékben. Azt reméltük, hogy a mi transzgénikus rizseinkből izolált fehérjéken elvégzett MALDI-TOF vizsgálatok segítségével közelebb juthatunk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a szabad cisztein aminosavak milyen kölcsönhatás kialakítására képesek a rizs endosperimiumban a prolamin fehérjék jelenlétében. Továbbá arra a kérdésre is választ kaphatnánk, hogy a búza fehérje alegységek vajon önmagukkal alkotnak polimereket avagy



intenzívek kölcsönhatnak a rizs tartalékfehérjéivel. Sajnos az elküldött mintákból az ausztrálok nem tudtak semmi kézzelfogható eredményt elérni.

### 3-4. év

#### **LMW glutenin és a 3 féle analóg glutenin (ANG) rekombináns fehérjék bakteriális expressziója és inkorporálása rizs alaplisztbe**

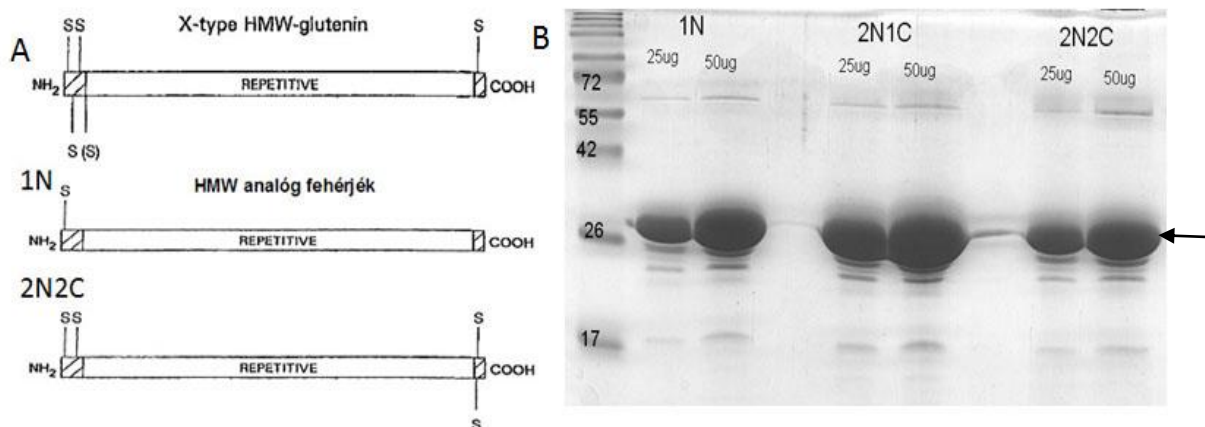
A glutenin makropolimer a sikér egyik fő összetevője, mely meghatározza a tészta nyújthatósági tulajdonságait. A glutenin alegységfehérjék specifikus szerepe a glutenin makropolimer szerkezeti felépítésében eddig még nem teljesen tisztázott.

Az ismert, hogy búza glutenin fehérjék egyik jellemző tulajdonsága, hogy szabad SH csoportjaik által inter- és intramolekuláris diszulfid hidak kialakítására képesek, melyek fontos szerepet játszanak a sikér polimerszerkezetének kialakításában. Számos modell létezik a sikér szerkezetének leírására, mint pl egy, ahol a HMW alegységek egy lineáris vázat alkotnak, melyről az LMW alegységfehérjék oldalirányban ágaznak el. Az alegységek közötti kapcsolódást befolyásolja az alegységek diszulfid-híd kialakítási képessége. Korábban bizonyították, hogy a cisztein aminosavak száma és helye az LMW-GS fehérjéken belül meghatározza, hogy a fehérjének lánchosszabbító vagy lánctermináló hatása van a polimer felépítésében (Lindsey és mtsai. 2002).

A cisztein aminosavak hatásának tanulmányozására Tamás és mtsai. (2002) létrehozta ún. analóg fehérjét (ANG), olyan módosított C hordein molekulát, melyek egyedi rövid N és C -terminális doménnel rendelkeznek a központi repetitív régióhoz kapcsolva (5A. ábra).

Az ANG fehérjék az árpa C hordein fehérjék mutációjából származó fehérjék, melyek szerkezetileg hasonlítanak a búza  $\omega$ -gliadinokhoz. Háromféle analóg fehérjével dolgoztunk, melyek az N és C terminálison eltérő számú cisztein rezidumot tartalmaznak, így eltérő inter- és intramolekuláris diszulfidhíd kialakítására képesek. Az 1N fehérjék egy Cys molekulát tartalmaznak a N terminálison, míg a 2N1C molekulák 2 db Cys aminosavat az N és egy Cys-t a C terminális régióban, a 2N2C fehérjék pedig mindkét terminálison 2-2 cisztein aminosavat tartalmaznak (Tamás és mtsai 2002). Ezeknek az ANG fehérjéknek egy csoportját baktériumban expresszáltattunk és tisztítottuk, majd hatásukat a rizstészta dagasztási paramétereire tészta rekonstrukciós kísérletekben tanulmányoztuk (5B ábra).

Az *E. Coli*-ban expresszált glutenin analóg fehérje izolátumok 10mg (1N, 2N1C, 2N2C) mennyiségben rizs fehérjéi közé építettük be a korábban kidolgozott módszer segítségével.



5. ábra: A: ANG ( analóg fehérjék) sematikus ábrája B: Bakteriálisan expresszált és tisztított ANG fehérjék SDS-PAGE analízise

### ***Az ANG fehérjék inkorporációja rizstészta***

Az dagasztási kísérleteket a micro z-arm mixer egy prototípusával végeztük (BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék). A következő dagasztási paramétereket vizsgáltuk: tészta kialakulási idő (dough development time- DDT), tészta stabilitása (stability-ST) és az ellenállás rezisztenciája (resistance breakdown-BD). A tészták dagasztási görbéinek középvezetét a 6A-C ábra mutatja be.

A tészták dagasztási görbéin jól látszik, hogy az 1N és a 2N1C fehérjék hatására negatív irányba tolódtak el a görbék az ANG fehérjéket nem tartalmazó rekonstruált tésztákhoz viszonyítva. Ezzel ellentétben a 2N2C fehérjék beépítésének pozitív hatása volt a dagasztásra, egy a kontrollhoz viszonyított erősebb tésztát eredményezve.

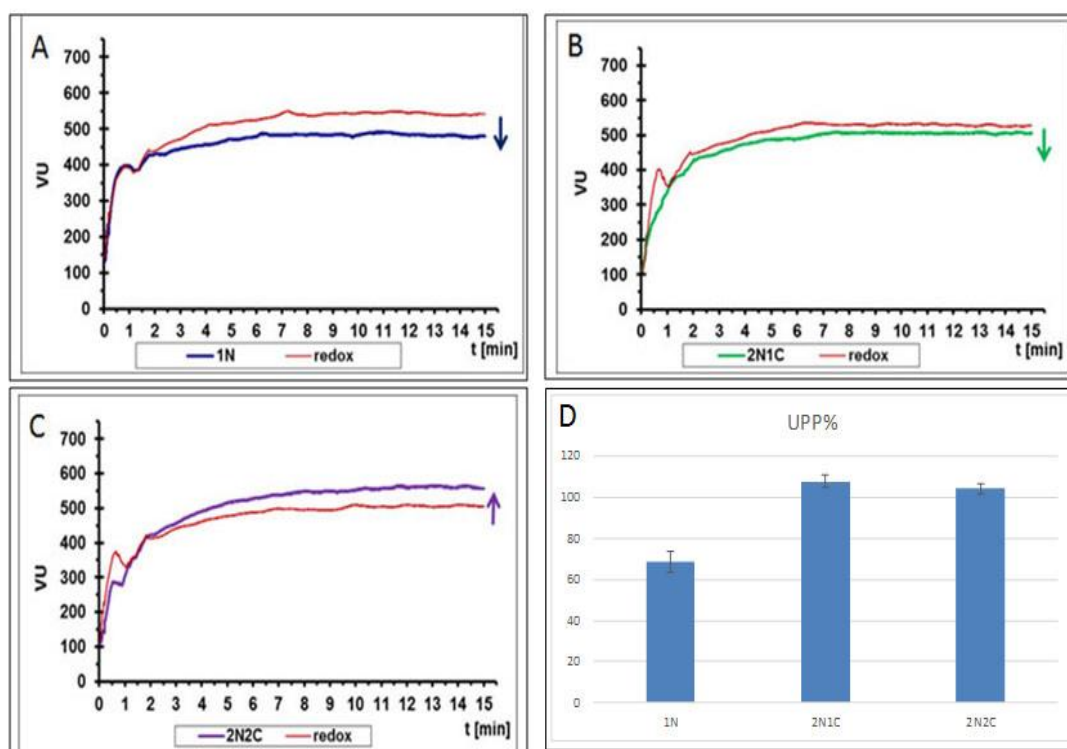
A páratlan számú ciszteint tartalmazó HMW-analóg fehérjék (1N és 2N1C) inkorporációja a kontrollhoz képest gyengébb tésztát eredményezett. A mikro z-arm mixer mérés során kisebb maximális rezisztencia értékeket, nagyobb rezisztencia ellenállást és a tészta stabilitásának csökkenését tapasztaltuk.

Ezzel ellentétben a rizstészta dagasztása során a tészta kialakulási idő az 2N2C fehérje alegységek inkorporációja után növekedett. A 10 mg fehérje beépítése 12%-ban megnövelte a DDT értékét a kontrollhoz képest. A tészta stabilitása nőtt, az ellenállás mértéke csökkent az inkorporáció után.

Tamás és mtsai. (1998) a korábbi, búzára elvégzett munkáikban azt demonstrálták, hogy a modell fehérjék inkorporálása után a makropolimer méreteloszlásában bekövetkező különbségek összefüggnek a modell fehérjék diszulfidkötő képességével. Az 1N fehérjék úgy viselkedtek, mint monomer fehérjék, és csak kis változást eszközöttek a glutenin makropolimer méreteloszlásában az inkorporáció után. Az 1N analóg fehérjék csökkentették a polimer átlagos molekulaméretét,

konzisztensen lánczáró hatással bírnak, míg a 2N2C alegységek arányosan növelték a siker fehérjék polimer frakcióját, következésképpen lánchosszabbító hatással rendelkeztek.

Hasonlóan a búza kísérletekben tapasztalt eredményekhez, a páratlan számú ciszteint tartalmazó fehérjék (1N és 2N1C) a rizstésztaiban is lánczáró hatásúnak mutatkoztak, míg a páros számú ciszteint tartalmazó fehérjék (2N2C) hatékonyan épülhetnek be a rizs polimer szerkezetbe, a tészta erősödését eredményezve, lánchosszabbító alegységként működve.



6. ábra: ábra: Inkorporált ANG fehérjék z-arm mixerres görbéi. A: 10 mg 1N, B: 2N1C és C: 2N2C fehérjék tartalmazó rizstészta dagasztási görbéi a re-oxidált (kontroll) görbékkel együtt. D: UPP% értékek az analóg fehérjék rizstésztaiba történő beépítése után. 1N, 2N1C és 2N2C: vizsgált analóg fehérjék

#### *A rizstészta fehérje mátrixának (polimerek) jellemzése (SE-HPLC kromatográfia)*

A vizsgált analóg molekulák lánczáró illetve lánchosszabbító tulajdonságát a polimerfehérjék méreteloszlásának vizsgálatával is bizonyítottuk. Az analóg fehérje molekulák rizstésztaiba történő inkorporálása után a fehérjék méreteloszlásának tanulmányozására itt is SE-HPLC analízist végeztünk a korábbiakban leírtak alapján. A kialakult tészta polimer fehérjék szerkezetének SE-HPLC vizsgálatakor az 1N inkorporációja esetén csökkent a polimer fehérje frakciót, valamint a polimer fehérjéket tartalmazó oldható és oldhatatlan frakció arányának (UPP%) csökkenését tapasztaltuk (6D ábra). Ez a hatás a 2N1C inkorporáció esetén nem volt kimutatható. A láncépítő tulajdonságú 2N2C HMW-analóg inkorporációjakor a tészta erősödését tapasztaltuk. A lánczáró

fehérjékkel ellentétben a maximális rezisztencia értékek, a tészta stabilitása, a polimer frakciók aránya mellett az UPP% értéke is növekedett.

### **A rizs polimerfehérje szerkezet tanulmányozása jelölt fehérjékkel**

A glutenin makropolimer a legfontosabb siker komponens, mely meghatározza a tészta nyújthatóságát. Korábbi kutatások azt bizonyították, hogy a glutenin polimer szerkezete változik a tészta keverés során (Lindsay és mtsai. 2000). A makropolimeren belüli kovalens kötések mennyiségét befolyásolja a cisztein aminosavak száma és pozíciója meghatározva ezzel ezen alegységfehérjék lánchosszabbító vagy lánctermináló hatását.

A jelenlegi technológiákkal nehéz LMW és HMW fehérje alegységeket tisztítani, így a cisztein molekulák számának és szerepének tanulmányozására Lindsey és mtsai. (2000) egy modell vad típusú fehérjét (árpa C hordein fehérje, mely homológ a búza  $\omega$ -gliadin fehérjéivel) és ennek mutáns változatait alkalmazták kísérleteikben.

Ehhez hasonlóan a pályázat során két modell fehérjét (1N és 2N2C) fluoreszes próbával történő jelölés után tészta rekonstrukciós kísérletekben vizsgáltunk. A jelölt fehérjék eloszlását konfokális fénymikroszkóppal tanulmányoztuk a dagasztás során a rizstésztaiban.

#### *Fehérjék jelölése FITC-cel*

A kísérletekhez az 1N és 2N2C fehérjéket a korábbiakban leírtak alapján *E. Coli*-ban expresszáltuk és tisztítottuk. A fehérjéket fluorophore fluorescein isothiocyanate (FITC)-vel jelöltük. 10 mg liofilizált ANG fehérjét 3 mL 50%-os n-propanol-0.1 M karbonát pufferben (pH 8.5) oldottuk. Ezután 3 mL FITC (10mg/ml DMSO-ban oldva) oldatot csepegtettünk az oldathoz. A fehérje-FITC oldatot 2 órán keresztül finoman kevertettük, majd a felesleges FITC eltávolítására a mintákat 0.1 M ecetsavval szemben 48 órán keresztül dializáltuk. A jelölt fehérjéket a további kísérletekig lefagyasztottuk. A FITC jelölés mértékét a fehérje festék arányában a következő egyenlettel határoztuk meg:

$MFITC/Mprotein = (6 \cdot 10^9 \times A_{496} \times Mr \text{ protein}) / C_{protein} \times Mr_{FITC} \times 10^{-3}$  ahol  $A_{496}$  = abszorbancia 496 nm-en,  $Mr$  = a fehérje molekulatömege,  $C_{protein}$  = fehérje koncentrációja,  $Mr_{FITC}$  a FITC molekula relatív molekulatömege. A C hordein molekulatömege 28 kDa, a FITC molekulatömege 389.4 Da. A tisztított fehérje koncentrációt commassie G-250 kötődéssel határoztuk meg.

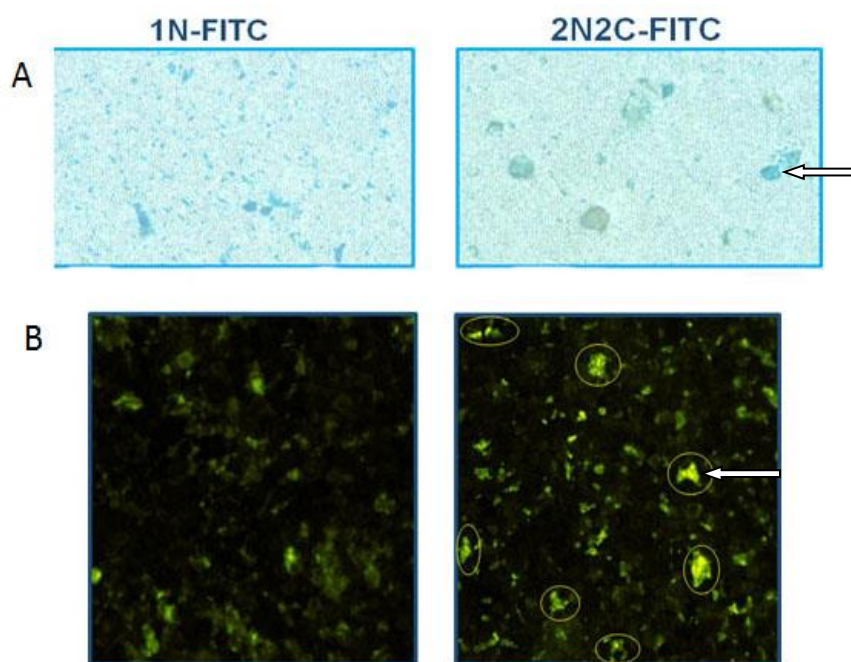
A jelölt fehérjéket ezután mikro z-arm mixerrel a már korábban leírt módszer segítségével inkorporáltuk a rizstészta fehérje szerkezetébe, majd meghatároztuk a dagasztási paramétereket. A tészta mintát vettünk azon a ponton, mikor a tészta rezisztencia értéke (PR) eléri a maximumot,

azaz a maximális tésztakialakulási időnél (DDT), majd az ezt követően minden 5 percben. A dagasztási idő teljes hossza 20 perc volt.

A kb 2 mm<sup>3</sup> –nek megfelelő mennyiségű tésztákat a maximum rezisztencia értékek elérése után 40x magnitúdón konfokális lézer mikroszkóppal (488/510-30 nm spectra Leica CLS Microscope) analizáltuk. A tésztákból vett mintákat Coomassie Brilliant Blue-val festve fénymikroszkóp alatt is tanulmányoztuk (7A ábra). Az ábra a maximális ellenállás értékét elért téosztából vett mintát mutatja be.

A konfokális mikroszkóp segítségével nyomon követhetjük a jelölt modell fehérjék eloszlását a téosztában. A metszeteken azt látjuk, hogy a két jelölt inkorporált fehérje eloszlása a rizstésztában különbözött megerősítve azt a tulajdonságukat, hogy a különböző glutenin fehérjék kölcsönhatása más és más a siker makropolimerben.

A mikroszkóp alatt megfigyelt mintákon látszott, hogy a FITC jelölt ANG fehérje alegységek diszulfidkötések kialakítására voltak képesek a rizstészta fehérjéivel. Mindkét fehérjealegység kötődik a fehérje mátrixhoz ahogy azt a fénymikroszkópos felvételeken látni lehet (7A ábra).



7. ábra. ANG-FITC (1N és 2N2C) fehérjéket tartalmazó rizstészták mikroszkópikus képe. A: Metszetek Coomassie Blue festéssel fénymikroszkóp alatt. B: Metszetek konfokális mikroszkópos képe.

A jelölt 1N és a 2N2C fehérjék eloszlása meglehetősen egyenetlen volt a téosztában, ahogy az a fluoreszcens jelből látszik (7B ábra). Az 1N alegységnek nem volt meghatározott szerkezeti konformációja. A konfokális lézer mikroszkópos kép alapján feltételezhetjük, hogy néhány diszulfid kötés kialakításában részt vesz, és annak a tükrében, hogy csak egy szabad cisztein molekulával rendelkezik ezért valószínű, hogy láncterminátorként viselkedik (7B ábra).

Ezzel szemben a jelölt 2N2C alegységfehérjék meghosszabbított szerkezetet mutattak a tészta baba történő beépítés után, ami megfelel lánchosszabbító tulajdonságaiknak. A dagasztás előrehaladtával a rizstészta baba inkorporált alegységek szerkezete hosszabb irányban terjeszkedő, különálló egységeket mutatott a mikroszkopikus képen. A dagasztás végével, az alegységek eloszlása egyre véletlenszerűbb volt, a tészta szerkezetében az aggregátumok voltak a jellemzőbbek (7B. ábra).

A jelölt fehérje alegységgel elvégzett kísérletek bizonyíthatják a beépített búza glutenin alegységfehérjék (jelen esetünkben a modell fehérjék) kölcsönhatásait, a rizst endogén fehérjéivel, illetve a cisztein molekulák számának szerepét a szerkezet kialakításában.

## Összefoglaló

A jelen pályázatban azt vállaltuk, hogy a búza tartalékfehérjéket egy sikérmentes környezetben vizsgáljuk (esetünkben a rizs), ahol a búza endogén fehérjék nem befolyásolják az eredményeket. A korábbi pályázatban létrehozott HMW-GS fehérjét termelő, és a japán együttműködés keretében kapott különböző glutenin fehérjealegységeket termelő transzgenikus rizsvonalakat is vizsgáltuk. Továbbá tészta rekonstrukciós kísérletekben *in vitro* körülmények között is tanulmányoztuk a búza glutenin, illetve glutenin analóg fehérjék hatását a rizs és búzátészta dagasztási paramétereire.

Sikeresen létrehoztunk, illetve vizsgáltunk különböző glutenin alegységfehérjéket termelő transzgenikus rizseket. A génexpressziós vizsgálatokból kiderült, hogy a búza endospermium specifikus promóterei hasonlóan szabályozzák a glutenin fehérjék transzkripcióját a rizsben, mint a búzában. A PDI fehérje megnövekedett expressziója a transzgenikus rizsekben feltehetően segíti a fehérjék másodlagos szerkezetének felvételét, illetve az inter-és intramolekuláris diszulfid kötések kialakítását mind a búza alegységfehérjék, mind pedig a rizs polimer fehérjéi között.

Sikeres keresztezéssel új összetételű HMW és LMW glutenin alegységeket termelő transzgenikus rizsvonalakkal rendelkezünk, melyek lehetőséget adnak újabb kísérletek elvégzésére, illetve ezen fehérjék jobb megismerésére.

A rizslisztből készített tészta dagasztási tulajdonságait a búzánál sikerrel alkalmazott mikro z-arm mixer technikával jellemeztük. A különböző búza glutenin alegységekkel inkorporációs kísérleteket végeztünk rizs és búzalisztbe, majd összehasonlítottuk ezen fehérjék hatását a dagasztási paraméterekre. Valamennyi esetben pozitív változást figyeltünk meg a kontroll tésztákhoz képest, és a inkorporáció után egy erősebb, stabilabb tésztát kaptunk.

A kísérletekből az is kiderül, hogy a különböző egyéni HMW glutenin alegységek kombinációban történő inkorporációja eltérő hatással volt a rizstészta dagasztási paramétereire a búzaliszthez viszonyítva. A búza alapliszten végzett korábbi kísérletek szerint az olyan egyéni HMW glutenin alegységek páronkénti (Dx5+Dy10, vagy 2+12) inkorporációja, ahol az alegységek 1:1 arányban voltak jelen szinergikusan növelte a dagasztási paramétereket. Az inkorporált Bx6, Bx7 alegységek arányának csökkenése a By8 alegységfehérjékhez képest a búzában egy platót eredményezett, míg a rizstészta dagasztási paramétereit maximum vagy minimum jellegű mutattak. Továbbá megállapítottuk, **a rizs esetében a fehérjék beépítése szinergikus hatással volt a rizstészta dagasztási paramétereire, addig fehérjék ugyanilyen arányú beépítése a búzaliszt fehérje mátrixába nem mutatott szinergikus hatást** a Bx és By típusú alegységek esetében. Ennek oka feltehetően a rizs polimerek és a búza gluteninek között létrejött egyéni kölcsönhatásnak az eredménye.

Az irodalomból ismert, hogy a HMW glutenin alegység molekuláknak hasonló a szerkezetük, amennyiben mindegyik tartalmaz egy hosszú, ismétlődő aminosav szekvenciából álló központi domént. Ez a szerkezeti elem méretében igen változó, s ez magyarázhatja egyrészt az egyes molekulák minőségre gyakorolt hatásában való eltérést. A szerkezet a molekulának egy hosszú pálcikaformát és elasztikus rugó (molekuláris rugó) kölcsönöz. A központi elemet közrefogó N- és C-terminális régió tartalmazza többnyire a cisztein aminosavakat, melyeknek elsődleges szerepe van a sikérben található óriás molekulatömegű polimerek kialakításában, diszulfid hidakon keresztül. Feltételezhetjük, hogy a cisztein aminosavak száma és eloszlása a molekulán belül nagy hatással van a polimer biofizikai tulajdonságaira. A legjobb tulajdonságot hordozó 1Dx5 alegység négy ciszteint tartalmaz az N- és 1-et a C-terminálisban. A négy SH csoport az N-terminális régióban teljesen egyedi -a többi x-típusú fehérje csak 3-at tartalmaz- és feltehetően erős hatással van az 1Dx5 alegység kiemelkedően jó tulajdonságára.

Az analóg fehérjék rizstésztaiban történő vizsgálata újabb bizonyítékként szolgál a szabad cisztein molekulák számának és elhelyezkedésének szerepére a diszulfid kötések kialakításában. A mikroszkopikus technika segítségével nyomon tudtuk követni a beépített búza analógfehérjék eloszlását a rizstésztaiban. Megfigyeléseink bizonyítékkul szolgálnak a rizsfehérjék és az analóg búzafehérjék kölcsönhatására.

A dagasztásra gyakorolt hatásával párhuzamosan a fehérjék polimer-kémiai tulajdonságait is követtük. A rizstészta dagasztási paramétereit és a fehérjefrakciók mennyisége közötti viszony tanulmányozása során megállapítottuk, hogy – a búzatiszta tulajdonságaival analóg módon – szoros összefüggés mutatható ki a lisztben található nagyméretű polimerek UPP%-ban kifejezett mennyisége és a rizstészta dagasztási tulajdonságai között.

Az eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy a rizs tartalékfehérjék mennyisége, polimer/monomer aránya, az oldhatatlan polimer fehérje frakció mennyisége szerepet játszik a tészta dagasztási tulajdonságainak kialakításban. A rizs, mint modell rendszer alkalmas a búza tartalékfehérjéknek a technológiai paraméterek kialakításában betöltött szerepének a vizsgálatára. A kísérletek rendelkezésünkre álló hiánymutáns búzavonalakból izolált egyes HMW glutenin alegységek 10%-os beépülése a rizsfehérje mátrixba megváltoztatta annak funkcionális tulajdonságait. Ebből az következik, hogy az *in vivo* transzgénikus rizsben expresszált HMW glutenin alegységfehérje ilyen mértékű termelődése hatással lehet a rizs dagasztási tulajdonságaira. Az általunk létrehozott HMW-GS alegység fehérjét termelő rizs csak egy előnemesítési folyamat eredménye, amiből nemesítési folyamatokban elit fajtákkal összekeresztelve megfelelő terméshozamú és rezisztenciájú fajta hozható létre.

Az ilyen fehérjét termelő rizsfajta olyan fogyasztói kör számára teremthet lehetőséget sütőipari termékek fogyasztására, akik panaszaik miatt eddig nem élvezhették. Az MTA Martonvásári kutatócsoportjában elvégzett kísérletekből (Dr. Juhász Angéla) feltételeztető, hogy a toxikusnak vélt HMW GS fehérjék csak a cöliálkísok egy részére jelentenek igazi veszélyt, míg egy jelentős csoportjuk biztonságosan fogyaszthatna ilyen termékeket. Ezen feltételezés alátámasztása jelenleg is folyik. A jövőben a HMW glutenin alegységben dúsított rizs lehetséges alkalmazási területeit, illetve a célkitűzésben megfogalmazott gluten intoleranciával rendelkező betegek számára az új rizsfajta fogyasztásának lehetőségét esetleges toxikológiai vizsgálatok is igazolhatják.

Az új tulajdonságú, jobb dagasztási paramétereket mutató, többféle búzafehérjét expresszáló rizslisztek pedig esetleg alkalmasak lehetnek egy jobb sütő ipari tulajdonsággal rendelkező rozskenyér előállítására. A toxikológiai vizsgálatok eredményétől függően pedig ezek a rizslisztekből készült termékek alternatív élelmiszerként szolgálhatnak a lisztérzékenységben szenvedők számára. A BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tsz-én, Tömösközi Sándor laboratóriumában mikro méretben (10 g) kenyérsütési kísérleteket is elkezdtünk annak vizsgálatára, hogyan hatnak a beépített búzafehérjék a sütőipari tulajdonságokra (pl. térfogat, bélszerkezet).

A pályázat eredményeként a búza tartalékfehérjék technofunkcionális tulajdonságait tudtuk vizsgálni olyan mélységben és olyan részletekben, mely a korábban használatos vizsgáló módszerrel nem volt lehetséges.

A rendszer kialakítása során olyan paramétereket vizsgáltunk, melyeket eddig még senki nem vizsgált- Az OTKA által támogatott projektnek köszönhetően olyan adatok birtokába juthattunk és tehetünk közzé a tudományos világ számára, melyek alapvető elméleti és gyakorlati újdonságnak számítanak. Ilyen többek között búza tartalékfehérjék szinergikus hatása a rizstészta dagasztási paramétereire, vagy a tartalékfehérjék eloszlása a rizstésztaiban.



Az új modell rendszerben véleményünk szerint finomabb részletekben vizsgálhatjuk a tartalékfehérjék különböző szerkezeti tulajdonságait illetve hatását a polimerfehérjék szerkezetére és a dagasztási paraméterekre.

Közelebb jutottunk a siker fehérje szerkezetének pontosabb megismeréséhez, például az x- és y-típusú HMW glutenin fehérje alegységek kapcsolódásának eddig nem ismert, ill. nem bizonyított részleteit írhattuk le.

Az új modell rendszerrel nyert molekula szerkezet-funkció összefüggések segítségével olyan új rekombináns tartalékfehérjék tervezhetők, melyek búza transzformálásban célzottan használhatók az egyes végfelhasználói igények kielégítésére. A pályázatban leírt, sikeres munka eredményeire alapozva a későbbiekben kidolgozható egy újabb kutatási projekt, melynek célja új típusú élelmiszer (funkcionális élelmiszer) előállítás.

## **Irodalom**

Araki, E., Ikeda, T. M., Ohgihara, Y., Toyoda, A. & Yano, H. (2008). Development of Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) Expressing Wheat High-and Low-Molecular-Weight Glutenin Subunit Proteins. *Breeding Science*, 58(2), 121–128.

Capocchi, A., Galleschi, L., Saviozzi, F., Isolation of Wheat High Molecular Weight Glutenin Subunits from Durum Wheat. (1999). *Cereal Chemistry*. 77(2):105–106.

Candler, D., Szabo, C., Murray, D., and Békés, F. (1996) In vitro polymerisation of glutenin subunits using protein disulphide isomerase. *Proc. 6th Intern. Workshop on Gluten Proteins*, pp.: 133-136., Ed.: Wrigley, C.W.

Dowd C and Bekes F, Large scale expression and purification of high molecular glutenin subunits. (2002) *Protein Expression and Purification*. 25:97-104.

Grimwade, B., Tatham, A. S., Freedman, R. B., Shewry, P. R. & Napier, J. A. (1996). Comparison of the Expression Patterns of Genes Coding for Wheat Gluten Proteins and Proteins Involved in the Secretory Pathway in Developing Caryopses of Wheat. *Plant Molecular Biology*, 30(5), 1067–1073.

Jain, M. (2009). Genome-Wide Identification of Novel Internal Control Genes for Normalization of Gene Expression during Various Stages of Development in Rice. *Plant science*, 176(5), 702–706.

Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. & Khurana, J. P. (2006). Validation of Housekeeping Genes as Internal Control for Studying Gene Expression in Rice by Quantitative Real-Time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 646–651.

- Li, Q.-F., Sun, S. S. M., Yuan, D.-Y., Yu, H.-X., Gu, M.-H. & Liu, Q.-Q. (2010). Validation of Candidate Reference Genes for the Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data in Rice During Seed Development. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(1), 49–57.
- Liu, Y.-G., Nagaki, K., Fujita, M., Kawaura, K., Uozumi, M. & Ogihara, Y. (2000). Development of an Efficient Maintenance and Screening System for Large-insert Genomic DNA Libraries of Hexaploid Wheat in a Transformation-competent Artificial Chromosome (TAC) Vector. *The Plant Journal*, 23(5), 687–695.
- Lindsay, M.P., Tamás, L., Appels, R., and Skerritt, J.H. (2000) Direct evidence that the number and the location of cysteine residues affect glutenin polymer structure. *J. of Cereal Sci.* 31: 321-333.
- Oszvald, M., Tömösközi, S., Tamás, L., Békés, F. (2009). Effects of Wheat Storage Proteins on the Functional Properties of Rice Dough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- Oszvald, M., Tömösközi, S., Larroque, O., Keresztényi, E., Tamás, L., Békés, F. (2008). Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro Z-arm mixer. 2008. *Journal of Cereal Science* 48(1):68-76
- Oszvald, M., Jenes, B., Tomoskozi, S., Bekes, F., Tamas, L. (2007). Expression of the 1D×5 high molecular weight glutenin subunit protein in transgenic rice. *Article in Cereal Research Communications* 35(4):1543-1549
- Bekes, F., Gras P. W. Gupta R. B.. Mixing Properties as a Measure of Reversible Reduction and Oxidation of Doughs. (1994) *Cereal Chemistry* 71(1):44-50  
January 1994
- Oszvald, M., Balázs, G., Pólya, S., Tömösközi, S., Appels, R., Békés, F., et al. (2013). Wheat Storage Proteins in Transgenic Rice Endosperm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7606–7614.
- Payne, P.I., and Seekings, J.A. (1996) Characterisation of Galahad-6, Galahad-7 and Galahad-8, isogenic lines that contain only one HMW glutenin subunit. Pages 14-17 in: *Gluten '96*. C.W.Wrigley, ed. Royal Aust. Chem. Institute: Melbourne .
- Shewry, P. R. & Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, 25(3), 207–227.
- Shimoni, Y., Zhu, X. Z., Levanony, H., Segal, G. & Galili, G. (1995). Purification, Characterization, and Intracellular Localization of Glycosylated Protein Disulfide Isomerase from Wheat Grains. *Plant Physiology*, 108(1), 327–335.
- Tamás, L., Gras, P.W., Solomon, R.G., Morell, M.K., Appels, R., Békés, F. (2002). Chain Extension and Termination as a Function of Cysteine Content and the Length of the Central Repetitive Domain in Storage Proteins. *Journal of Cereal Science* 36:313-325.