

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Glutamin szintetáz aktivitás és fehérje mintázat változások
búza levélben *Fusarium* fertőzés hatására

Készítette: Németh Edit
Biológus MSc szakos hallgató
II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék

Témavezető:
Dr. Pécsváradi Attila
Egyetemi docens

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Irodalmi áttekintés	6
A nitrogén asszimilációja	6
A glutamin-szintetáz enzim.....	7
Levél szeneszencia	10
Fusarium.....	11
Célkitűzések.....	12
Anyagok és módszerek	13
A kísérleti növény	13
Fehérjekivonat készítése	13
A fehérjekoncentráció meghatározása	14
A glutamin szintetáz in vitro aktivitás mérése	14
A fehérjekivonat tisztítása.....	15
Poliakrilamid gélelektroforézis	16
Natív poliakrilamid gélelektroforézis	16
Kétdimenziós gélelektroforézis.....	18
Denaturáló izoelektromos fókuszálás (IEF-urea).....	18
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis.....	19
Ezüstfestés.....	20
Western blot analízis	20
Eredmények és értékelésük.....	22
Fehérjetartalom mérések	22
Natív gélelektroforézis	23

Western blot analízis	24
In vitro glutamin-szintetáz aktivitás.....	25
Kétdimenziós gélelektroforézis.....	26
Denaturáló izoelektromos fókuszálás	26
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis.....	28
A vizsgált búza növények érzékenysége.....	29
Összefoglalás	30
Felhasznált irodalom.....	32
Köszönetnyilvánítás.....	35
Nyilatkozat.....	36

Rövidítések jegyzéke

APS: ammónium-perszulfát

ATP: adenzin-trifoszfát

BCIP: bromo-kloro-indolil-foszfát

DB: előhívó puffer

DTT: ditio-treitol

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát

Fd: ferredoxin

GOGAT: glutamin-oxoglutarát aminotranszferáz, glutamát-szintáz

GS: glutamin-szintetáz

MW: molekulatömeg

NADH: redukált nikotinsavamid-adenozin dinukleotid

NBT: nitro-blue-tetrazolium

NiR: nitrit-reduktáz

NR: nitrát-reduktáz

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

Pi: anorganikus foszfát

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

Rubisco: ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SPS: szacharóz-foszfát szintáz

TBS: Tris puffer (sós)

TEMED: tetrametiletiléndiamin

TRIZMA base: tris-(hidroximetil-) amino-metán

TWEEN 20: polioxietilén(20)-szorbitán-laurát, poliszorbát 20

Bevezetés

A növények növekedésében, fejlődésében és reprodukciójában a nitrogén esszenciális makroelem. A nitrogén nemcsak nukleinsavak, aminosavak, fehérjék és koenzimek, hanem növekedés szabályozó anyagoknak, növényi hormonoknak, valamint más metabolitoknak is építőeleme.

A felvett nitrogén beépítésében rendkívül fontos szerepet játszik a glutamin-szintetáz enzim. Az általa katalizált ATP-függő reakció révén ammónium-ionból és glutaminsavból glutamin jön létre, mely további biokémiai folyamatokban vehet részt. Az így szerves vegyületbe épített nitrogén a későbbiekben már részt vehet más aminosavak, fehérjék, enzimek felépítésében.

Szárazföldi növényekben a szén-dioxid fixálás legjelentősebb enzime a Rubisco. Ez egy 8 kis és 8 nagy alegységből álló, nagy molekulású fehérje, mely nagy mennyiségű nitrogént tartalmaz a felépítő aminosavak aminocsoportjaiban. Ezzel a Rubisco a nitrogén remobilizáció legfőbb forrása. A növényekben a raktározott tápanyagok felhalmozása, a szenescencia és a stressz mind beindíthatják a nitrogén remobilizációját.

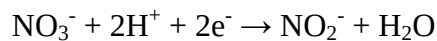
A búza (*Triticum aestivum* L.) az egyik legjelentősebb gabonanövényünk az élelmiszer ellátásban. A *Fusarium* fertőzés komoly károkat okozhat évről évre a termésben. A betegség alaposabb megismeréséhez szükséges a fertőzés okozta élettani változások tanulmányozása a búzanövényben.

Kísérleteinkben a fehérjetartalmat, és a glutamin-szintetáz enzimet érintő változásokat tanulmányoztam. Megvizsgáltuk búza zászlóslevélben a GS1 és GS2 izoformák mennyiségi változásait western blot alkalmazásával, valamint összaktivitásukat. Kidolgoztunk egy olyan kétdimenziós gélelektroforetikus módszert, amely alkalmas *Fusarium* fertőzött minták fehérjemintázat változásainak összehasonlítására.

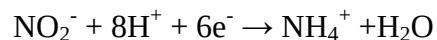
Irodalmi áttekintés

A nitrogén asszimilációja

A nitrogén a növények számára az egyik legfontosabb ásványi anyag. Bár egyes növények szimbiózisban élnek olyan mikróbákkal, melyek képesek a légköri nitrogén megkötésére, mégis a talajoldatban jelen lévő nitrát és ammóniumion jelenti számukra az elsődleges nitrogénforrást. A felvett nitrát redukciójában a nitrát-reduktáz (NR, EC 1.6.6.1) és a nitrit-reduktáz (NiR, EC 1.7.7.1) enzimek vesznek részt. A nitrátot a citoplazmában található nitrát reduktáz a következőképpen redukálja:

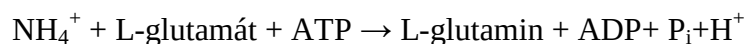


A folyamat lezajlásához NADH esetleg NADPH szükséges redukáló ágensként. A keletkezett nitrit redukcióját a nitrit-reduktáz végzi:



Az enzim jelen van a fotoszintetizáló szövetek kloroplasztisaiban, valamint a gyökérsejtekben fellelhető plasztiszokban. Az enzimreakció redukálószere a ferredoxin.

A fenti reakcióban keletkezett és a felvett ammóniumionokat is a glutamin-szintetáz (EC 6.3.1.2.) és glutamát-szintáz enzimek építik be szerves vegyületekbe. (Lea, 1997). Az ammóniumionokat a GS a következőképpen építi be glutaminba:



A folyamat lejátszódásához szükséges bivalens fémionok, általában mangán- vagy magnéziumionok kötődése. Ez a glutamin-szintetáz által katalizált úgynevezett bioszintetikus reakció, melynek végeredményeként L-glutamin keletkezik. (Eisenberg, 2000)

Az L-glutamin a glutamát-szintáz (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1) szubsztrátjaként az alábbi reakcióban vehet részt:



A keletkezett glutamát újra részt vehet a GS által katalizált reakcióban, vagy aminotranszferázok segítségével továbbíthatja az asszimilált ammóniát más szerves vegyületek szintéziséhez. (Layzell, 1990)

Magasabbrendű növényekben a GOGAT két különböző izoformája van jelen, a ferredoxin-függő Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) és a NADH-függő NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14). Ezek eltérnek molekulasúlyukban, alegység összetételükben, enzim kinetikájukban, redukálószer specifitásukban és metabolikus funkciójukban. A két izoforma megtalálható mind a zöld, mind a nem zöld szövetekben (Blanco, 2008).

A GOGAT a nodulusokban leginkább NADH-GOGAT formában van jelen, ami a glutamin-szintetázzal együtt lehetővé teszi a bakteriális nitrogén fixációból származó ammóniumion asszimilációját (Gregerson, 1993).

Az ammóniumion és így a nitrogén asszimilációjában a GS/GOGAT ciklus nem az egyetlen, de a legjelentősebb ismert reakcióút.

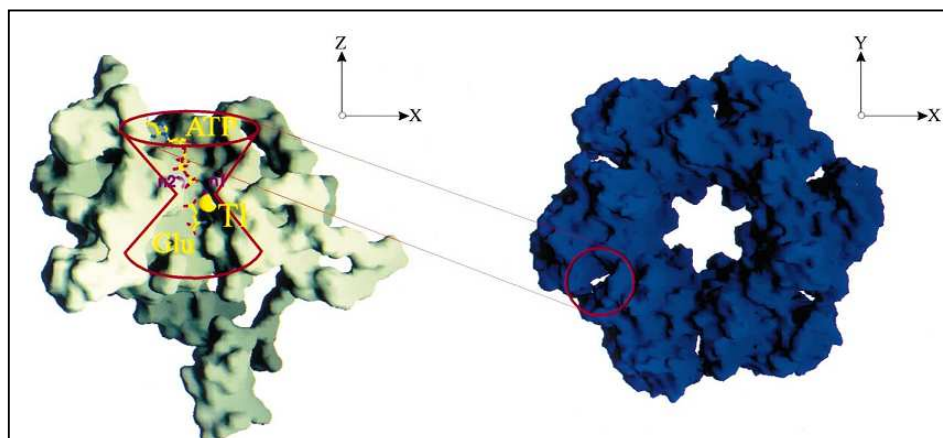
A glutamin-szintetáz enzim

A növényekben a glutamin-szintetáz a glutamát-szintázzal és a glutamát-dehidrogenázzal (GDH, EC 1.4.1.2) kulcsszerepet játszik az ammónia asszimilációjában. Az ammónia vagy ammóniumion származhat közvetlenül az ásványi anyag felvételtől, a biológiai nitrogénfixációból, fotorespirációból és aminosav lebontásból. A GS a glutamin szintézisét katalizálja ammóniából és glutamátból ATP felhasználása mellett. Az enzimnek két típusát különböztetik meg, a GSI-et és GSII-t, melyek egy legalább 1000 millió éve lejátszódott génduplikáció eredményeként jöttek létre, még a prokarióták és eukarióták szétválása előtt. A GSI-et prokarióta, míg a GSII-t eukarióta típusú fehérjeként emlegetik. (Biesiadka, 1997). A jellemzően eukarióta GSII-t *Rhizobium* fajokban is megtalálták. A GSII jelenlétét horizontális géntranszferrel magyarázzák. (Turner, 2000)

A fotoszintetizáló prokarióta cianobaktériumokhoz sorolt *Synechocystis* sp. PCC 6803-ban azonosították a GSIII típust. A GSIII aminosav szekvenciájában eltér mind a tipikusan prokarióta GSI, mind az eukarióta GSII típusoktól, aktivitásban a GSI-gyel mutat hasonlóságot, bár a teljes enzim aktivitáshoz nem járul hozzá nagy arányban (García-Domínguez, 1997).

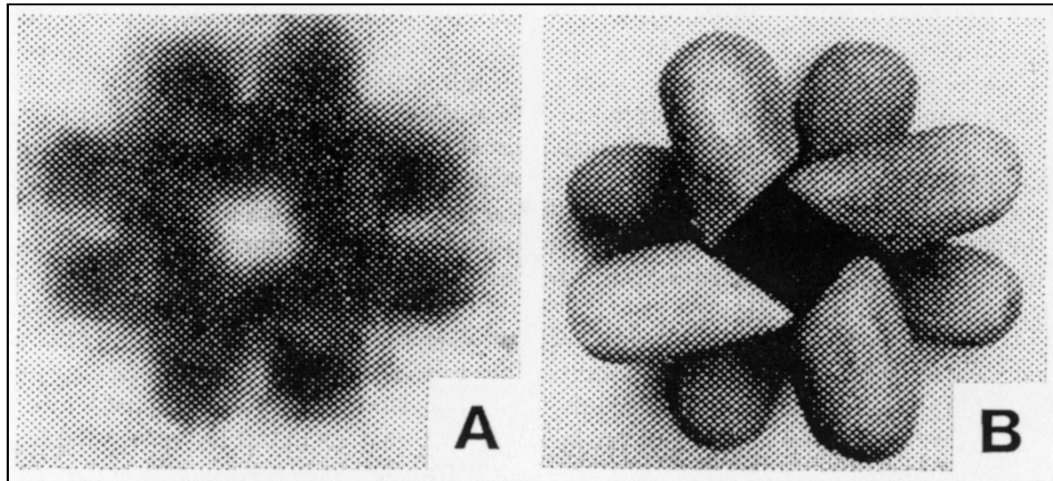
A GSIII-ról szerzett ismereteink még kiegészítésre szorulnak, viszont a GSI és GSII már régebb óta tanulmányozott enzimtípusok, a GSI szerkezete részletesen ismert.

A bakteriális GS dodekamert két, egymással szembenéző hat alegységből álló gyűrű alkotja. A monomerek 12 aktív helyet biztosítanak, melyek mindegyike egy kettős tölcsérként írható le, amely egyik végéhez ATP, másikhoz glutaminsav kötődhet. Az enzim katalitikus aktivitásához alegységenként két bivalens fémion szükséges. Az ATP kötőhely a tölcsér tetejénél, a GS külső felszínén található, míg a két tölcsér aljának csatlakozási pontjánál két bivalens kation kötőhely van egymástól 6 Å távolságra.



1. ábra: A bakteriális glutamin-szintetáz aktív centruma (balról) és harmadlagos szerkezete (jobbról) (Eisenberg, 2000)

Az eukarióta és a bakteriális GS szerkezete eltérő. Az eukarióta GS pontos háromdimenziós struktúráját még nem ismerjük, bár elméleti modellek már léteznek. A GSII nyolc alegységes polipeptid. Az aktivációs mechanizmusa hasonló, mint a GSI esetében, az aktív helyek kis fajok közötti variabilitása miatt. Ahogyan a bakteriális GS esetében is, az eukarióta GS aktivitásához is szükséges alegységenként két bivalens fémion, magnézium (Mg(II)) és mangán (Mn(II)) (Eisenberg, 2000).



2. ábra: Az eukarióta GS szerkezete. (A): Borsóból izolált enzim elektronmikroszkópos képe. (B) Az izolált GS egyszerűsített modellje (Tsuprun, 1980)

A növényekben több GS izoforma van jelen. A búza növény hajtásában a citoszolikus GS1 és a plasztidikus GS2, míg a gyökerében a gyökérsejtek citoplazmájában a GSr izoforma található meg (McNally, 1983). A két izoforma élettani jelentősége eltérő. A GS2 elsősorban a nitrát redukcióból és a fotorespirációból származó ammónia asszimilációját végzi. A kloroplasztisban képződő ammónia beépítéséért felelős GS2 aktivitása erősen fényfüggő, mivel a működéséhez szükséges ATP nagy mennyiségben csak megvilágítás alatt áll rendelkezésre, valamint a sztróma pH változása is hozzájárul az aktivitás csökkenéshez a sötét periódusban. A GS1 pH optimuma alacsonyabb, az enzim esszenciális szerepet tölt be a sötétben végbemenő glutamin előállításban. A GS1 izoforma által képzett glutamin lehetővé teszi a nitrogén remobilizációját a phloemen keresztül. A GSr a gyökérben zajló elsődleges ammónia asszimiláció folyamatában vesz részt. (Hirel B, 1980)

A levelekben jelenlévő GS1 és GS2 izoenzimek különböző mértékben járulnak hozzá a mérhető teljes GS aktivitáshoz. Búza esetében az összaktivitás jelentős részét, korábbi adatok szerint körülbelül 80-90%-át a GS2 adja (McNally, 1983, Pécsváradi, 2009). Ez alapján elmondható, hogy a GS teljes aktivitásának mérése elsősorban a GS2 izoenzim működéséről tájékoztat.

Levél szeneszencia

A levelek öregedése nem feltétlenül jelent egyet egy növény elpusztulásával. A levél szeneszenciának az egyéves és évelő növények számára egyaránt jelentős szerepe van úgy a növekedési és fejlődési folyamatokban, mint az öregedésben.

A kloroplasztisz elsőként esik áldozatául a katabolikus folyamatoknak, mikor a szeneszencia a többi sejtorganellumot még nem, vagy alig érinti. A tilakoid membránrendszer átalakul, a granális szerveződés felbomlik, a makromolekulák lebontása megkezdődik. A kloroplasztiszban lokalizálódó Rubisco (ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz, EC 4.1.1.39) a szén-dioxid fixáció kulcsenzime, valamint az egyik legjelentősebb szén- és nitrogénforrás a növények számára. Az enzim szeneszencia során degradálódik, melynek eredménye képpen az öregedő levelekből, jelentős mennyiségű nitrogén szabadul fel, amely tápanyagot biztosíthat a fiatal, fejlődő szövetek számára. (Prasanth, 2011)

Az idősebb levelekben szabad aminosavként a glutamát van jelen legnagyobb mennyiségben. Korábbi mérések szerint rizsben a phloem nedvben található aminosavak 42%-a glutamin, és 12%-a aszparagin. Ezek az amidok főleg a Rubisco hidrolízisekor szabadulnak fel. A kloroplasztiszban lokalizálódó GS2 a felszabaduló glutamátból és ammóniumionból az öregedő levelekben elvégzi a glutamin szintézisét, amely az aszparaginsav lehetséges prekursora (Kamachi, 1991).

A nitrogén legnagyobb része glutamin és aszparagin formájában transzlokálódik a fejlődő magvakhoz, gyümölcsökhöz. Ezek az amidok járulnak hozzá legjelentősebb mértékben a magvakban végbemenő *in situ* aminosav szintézishez (Storey, 1978).

A szeneszencia a növények fejlődésének, és az utódgeneráció létrehozásának szükséges velejárója.

Fusarium

A búza a gabonanövények közül Magyarországon az egyik legfontosabb növény, mind gazdasági, mind élelmezési szempontból. A *Fusarium* fajok jelentős kárt okozhatnak a termésben, a nedvesebb évjáratokban. A rezisztencia háttere igen összetett, fejtörést okozva ezzel a rezisztencia nemesítőknek. Napjainkban is folynak kutatások a növényekben *Fusarium* fertőzések hatására lejátszódó folyamatok felderítésére.

A *Fusarium* kalászfertőzések jelentősen lecsökkentik a termésmennyiséget, és az általuk termelt gombatoxinok egyaránt veszélyt jelentenek az emberre és az állatokra. Bizonyos *Fusarium* fajok képesek növekedni a raktározott takarmányon, ami toxin tartalma miatt már nem lesz alkalmas az állatok etetésére. A kalászfuzárium fertőzés legszembeötlőbb jele az aszott, zsugorodott szemtermés. A magok nem csak a raktározott tápanyagok mennyiségében szenvednek kárt, hanem teljesen életképtelenné is válhatnak, csírázási képességüket elveszítik (Arya, 2010). A *Fusarium* fajok a még fiatal vagy a már kifejlett növényt is képesek megfertőzni. A *Fusarium graminearum* például a csírázáskor a mag és a csíranövény rothadását okozhatja.

Az európai gabonatermesztésben a *Fusarium* kalászfertőzésekért elsősorban a *F. graminearum* és *F. culmorum* fajok felelnek (Brandfass, 2006). A *Fusarium* fajok sokszínűsége, genetikai variabilitása miatt érdemes azokat külön vizsgálni. A különböző nemesített búzafajták is eltérő tulajdonsággal rendelkeznek, így a lejátszódó élettani folyamatok és eltérő rezisztencia háttér nem könnyíti meg a tudomány dolgát a *Fusarium* és a kultúrnövények közti interakciók felderítésében.

Célkitűzések

A növényi kloroplasztiszban lokalizált Rubisco bár a szén-dioxid fixálás esszenciális enzime, egyben remek nitrogén raktár is. Szükség esetén degradálódása bőséges nitrogénellátást biztosít. A nitrogén megkötésében és reasszimilációjában a glutamin-szintetáz enzim nélkülözhetetlen. Ismert, hogy különböző stressz hatásokra megváltozhat a növényi sejtek fehérje összetétele, a rendelkezésre álló enzimek aktivitása a háttérben zajló folyamatok miatt.

Kísérleteim során a *Fusarium culmorum* és *F. graminearum* kalászfertőzés hatására fellépő, a glutamin szintetáz izoenzimeket, fehérjetartalmat érintő változásokat kívántam tanulmányozni búzalevélen. Vizsgálataim célja megvizsgálni a búza levelében megtalálható GS1 és GS2 izoenzimek mennyiségét, azok összaktivitását, a teljes oldható fehérjetartalom alakulását. Szeretnék kidolgozni egy olyan kétdimenziós gélelektroforetikus eljáráson alapuló módszert, amely alkalmas mind az egészséges, mind a fertőzött búza levelekből származó fehérje extraktumok összehasonlító analízisére.

Anyagok és módszerek

A kísérleti növény

A vizsgálatainkhoz búza (*Triticum aestivum* L.) -80°C-on tárolt zászlós levelet használtunk fel. A növények szántóföldi körülmények közt nőttek. A mintavétel a Gabonakutató Intézet Kecskéstelepi telephelyén zajlott (2011.05.18.). A növényeken a kalász már megjelent, vagy „kalászhasban” állapotban volt.

Négy genotípust vizsgáltunk, négy külön parcellából (474, 483, 488, 501). Az első mintavételből származnak a fiatal kontroll mintáink. A parcellák másik felén a mintavételt követő 2-4 nappal mesterséges *Fusarium* kalászfertőzést végeztek, *F. culmorum* (1a), valamint *F. graminearum* (2a) gombafajokkal.

Fehérjekivonat készítése

Az előzőleg -80°C-on tárolt búza zászlósleveleket kerámia dörzsmozsárban homogenizáltuk 1:3 (g : ml) arányban hozzáadott kivonó pufferrel. A folyamatot kevés kvarchomokkal segítettük elő. A kivonatot Eppendorf-csövekben centrifugáltuk (6 perc 15000 rpm) Hettich Mikroliter centrifugával, majd összegyűjtöttük a felülúszót, amely egy primer fehérje extraktumként szolgált a későbbi kísérletekhez.

Az extrakciós puffer összetétele: 200 mM TRIZMA base, 2 mM EDTA- Na_2 , 3mM DTT, 1 mM GSH, 10 mM glicerol, 0,2 mM PMSF. A kivonó puffer szerepe a fehérjék oldatba vitele, azok megóvása a proteázok általi lebontástól (PMSF), mindemellett a pufferben lévő GSH akadályozza az -SH csoportok oxidációját, a detergens pedig a sejtmembránokat roncsolja.

A későbbiekben a kivonatot a GS aktivitás méréséhez, fehérje tartalom meghatározásához, és egy, a gélelektroforetikus vizsgálatok előtt tisztítási lépésként beiktatott fehérje kicsapáshoz és visszaoldáshoz használtuk fel.

A fehérjekoncentráció meghatározása

A fehérjekoncentráció méréseket Bradford (1976) módszere alapján végeztük. Ezzel a módszerrel spektrofotometriásan meghatározható az oldott fehérjék koncentrációja.

A méréshez 900 µl desztillált víz, 100 µl Bradford reagens és 5 µl növényi minta keverékét használtuk, melyet 595 nm-en fotometráltunk Uvikon XL (Secomam) típusú készülékkel. A referencia oldat 900 µl desztillált vizet és 100 µl Bradford reagenst tartalmazott.

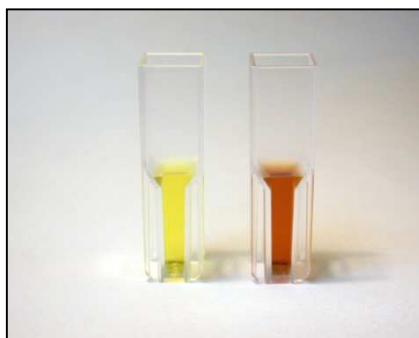
A glutamin-szintetáz *in vitro* aktivitás mérése

A kísérlethez az előzőekben leírt primer fehérje extraktumot használtuk. A glutamin-szintetáz által katalizált reakció egyik szubsztrátja, az ammóniumion hidroxilaminnal helyettesíthető, így egy módosított szintetáz reakció zajlik le (Pécsváradi, 2009):



A reakció egyik végtermékeként gamma-glutamil-monohidroxamát (GMH) képződik, ami savas közegben Fe^{3+} ionokkal sárgásbarna színű komplex vegyületet alkot. A reakcióelegy színváltozása 540 nm-en végzett spektrofotometriás méréssel detektálható. Mivel a GMH keletkezése és a GS specifikus aktivitása egymással egyenes arányosságban áll, a savas közegben képződő vas-komplex mennyisége közvetlen információt ad az enzimaktivitásról.

A reakcióelegy 300 µl mintát, 50 µl reakciópuffert tartalmazott. A reakciót 500 µl stop puffer (300 mM FeCl_3 , 670 mM HCl, 200 mM triklór-ecetsav) hozzáadásával állítottuk le. Ennek megfelelően a mintákat különböző módon kezeltük.



3. ábra: *In vitro* glutamin-szintetáz reakció.
0 perces (balról) és 20 perces minta (jobbról)

A 0 perces mintákhoz azonnal hozzáadtuk a stop puffert. A 20 és 60 perces mintákat rendre 20 illetve 60 percig inkubáltuk 30°C-os vízfürdőben, a stop puffert az inkubációs idő elteltével azonnal hozzáadtuk. A stop puffer az enzimefehérje denaturálásával képtelenné teszi azt katalitikus funkciójának betöltésére, így a keletkezett GMH-Fe komplex pontosan tükrözi a GS aktivitását. A stop puffer hozzáadása után egy centrifugálási lépés (6 perc, 15000 rpm) szükséges, a képződött csapadék miatt. A továbbiakban a felülúszót használtuk fel a spektrofotometriás méréshez. 600 µl felülúszóhoz 300 µl desztillált vizet adtunk, majd 540 nm-en mértük az oldat extinkcióját. Referencia oldatként desztillált vizet használtunk.

A fehérjekivonat tisztítása

A búzalevél mintákból készített fehérjekivonat még nagy mennyiségben tartalmaz olyan anyagokat, amelyek megnehezíthetik a későbbiekben az izoelektromos fókuszálást. Ezek lehetnek sejtfaltörmelékek, cukorszármazékok. A tisztítási lépés lényege, hogy a fehérje extraktumban jelenlévő fehérjéket kicsapjuk, majd centrifugálással összegyűjtjük, és újra visszaoldjuk. A folyamat végére bár nem kapunk 100%-os tisztaságú fehérje oldatot, a fókuszálás során élesebben elkülönülő sávokat kapunk.

A primer fehérje extraktumból 100 µl-t Eppendorf-csőben 900 µl acetonnal hígítunk, az elegyet overnight -20°C-on tartjuk, ezzel kicsapjuk az oldatban lévő proteineket. Centrifugálással összegyűjtjük az Eppendorf-cső alján, és egy csőbe helyezzük az összetartozó mintákat (Hettich Mikroliter centrifuga, 5 perc, 15000 rpm),

majd IEF-urea minta pufferben visszaoldjuk 8 órán át, szobahőmérsékleten. (A minta puffer összetételét lásd a denaturáló izoelektromos fókuszálásnál.)

Poliakrilamid gélelektroforézis

A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) lehetővé teszi, hogy elektromos térbe helyezett térhálós szerkezetű gélben fehérjéket válasszunk el. Az elválasztás hatékonyságát befolyásolhatjuk a futtatás hosszával és a gél háromdimenziós struktúrájának változtatásával.

A gélben a biszakrilammal keresztkötött poliakrilamid szálak határozzák meg a pórusméretet. A polimerizációt az ammónium perszulfát (APS) indukálja, a keresztkötések létrejöttét a TEMED katalizálja.

A módszer céljainknak megfelelő változtatásokat alkalmazva számos elválasztási eljárást rejt magában. Lehetővé téve a natív vagy a denaturáló poliakrilamid gélelektroforézist, vagy az izoelektromos fókuszálást. A kísérleteket kombinálva alaposabb elválasztást végezhetünk (kétdimenziós elválasztás), valamint a kapott géleket tovább vihetjük western blot analízisre.

Vizsgálatainkhoz vertikális elrendezésű Mini-Proten II Dual Slab (Bio-Rad) gélfuttató rendszert alkalmaztunk EPS 3501 XL (Amersham Biosciences) és EPS 500/400 (Pharmacia LKB) tápegységekkel.

Natív poliakrilamid gélelektroforézis

Natív-PAGE (Laemmli, 1970) során nem alkalmazunk semmilyen olyan denaturáló ágenst, amely miatt a fehérjék elveszítenék natív konformációjukat. A vizsgálat során megtartják felületi töltésüket, alakjukat, aktivitásukat, az alegységek nem válnak szét. Így a futtatás során a gélben kialakult térhálós szerkezetben a fehérjék futási sebességét molekulasúlyuk, alakjuk, és felületi töltésük is befolyásolja. A vizsgálathoz a primer fehérje extraktumot használtuk.

A gél alsó részében, a szeparáló gélben a tényleges elválasztás megy végbe. A gél felső része az úgynevezett stacking gél. Ebben alakítjuk ki a minták felviteléhez szükséges zsebeket. A futtatás elején a stacking gélben a fehérjék kis térfogatban koncentrálódnak, ami elősegíti az azonos molekulasúlyú fehérjék együtt haladását,

ennek köszönhetően ezek a proteinek a futtatás végére élesebb sávokat alkotnak. A teljes gél vastagsága 1,5 mm, a stacking gél hossza 10 mm, a szeparáló gél hossza 60 mm. A natív gél pontos összetételét az 1. táblázat tartalmazza.

Komponens	Stacking gél (végkoncentráció)	Szeparáló gél (végkoncentráció)
Akrilamid/Bisz-akrilamid (49.5% T, 3% C)	3,12% T	6,6% T
Gélpuffer (957 mM Tris-HCl, pH 8,5)	-	240 mM
Gélpuffer (158 mM Tris, H ₃ PO ₄ , pH 6,9)	40 mM	-
APS (10%)	0,053%	0,022%
TEMED	0,16%	0,26%

1. Táblázat: A natív gél összetétele.

T (total): az akrilamid és bisakrilamid együttes koncentrációja;

C (crosslinker): a bisz akrilamid koncentrációja a T-ben

A mintákat szacharóz mintafelvívő pufferrel keverve injektáltuk a kimosott géلزsebekbe Hamilton-pipetta segítségével. A puffer magas cukortartalma segíti elő, hogy a minta a zsebbe süllyedjen.

A futtatást 200 V feszültséggel, 25 mA áramerősséggel futtattuk. A futási frontot a mintafelvívő pufferben lévő Brómfenolkék festék jelezte. A festék kifutása után körülbelül 10 perccel állítottuk le az elektroforézist, így a futási idő összesen 2 óra 30 perc volt.

A géleken western blot analízissel azonosítottuk a GS-t. A blottolás után a géleken maradt fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá. Ehhez a géleket előzőleg fixálószerrel (50% metil alkohol, 10% ecetsav) kezeltük. A festék 10%-os ecetsavat és 0,0025% Coomassie Brilliant Blue G-t tartalmazott. A festési idő 10 perc volt, folyamatos, lassú rázatással. A gél 10%-os ecetsavban ráztuk a háttér elszíntelenedéséig.

Kétdimenziós gélelektroforézis

A kétdimenziós futtatásban lényegében két eltérő elektroforetikus módszert kombináltunk. Az első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk, a második dimenzióban pedig molekulásúlyuk alapján választottuk el. Végeredményben egy olyan foltmintázatot kaptunk a festési eljárás után, ahol minden folt egy molekulásúlyát és izoelektromos pontját tekintve különböző fehérjét jelölt.

Denaturáló izoelektromos fókuszálás (IEF-urea)

A fehérjék izoelektromos pontja (pI) szerinti elválasztási módszer az izoelektromos fókuszálás. Az izoelektromos pont azt a pH-t jelöli, amelyen a fehérjék össztöltése semlegessé válik, így pI-t elérve elveszítik elektroforetikus mobilitásukat. Az urea (karbamid) lefedi a negatív töltésű kötőhelyeket, jelenlétében a hidrogénkötések felbomlanak, viszont nincs hatással a fehérjék saját töltésére.

A futtatásokhoz a tisztított fehérje extraktumokat használtuk. Az fókuszálást 1,5 mm vastagságú gélen 15,5 órán át végeztük, először 10 percig 60 V feszültséggel, 20 mA áramerősséggel, majd 20 percig 150 V-on, 20mA-en, végül 15 órán át 200 V-on, 12 mA-en. A gél összetételét a 2. táblázat tartalmazza.

Komponens	Végkoncentráció
Akrilamid/Bisz-akrilamid (49.5% T, 3% C)	5%
Servalyt pH 3.5-10 (40%)	0,4%
Servalyt pH 4-6 (40%)	2%
Ammónium-perszulfát (10%)	0,042%
TEMED	0,17%
Urea	8 M

2. táblázat: A denaturáló izoelektromos fókuszáláshoz használt gél összetétele

T (total): az akrilamid és bisakrilamid együttes koncentrációja;

C (crosslinker): a bisz akrilamid koncentrációja a T-ben

Katód pufferként 20 mM-os NaOH oldatot, anód pufferként 10 mM-os foszforsav oldatot használtunk. A mintáinkat minta pufferrel (0,4% Servalyt pH 3.5-10, 2% Servalyt pH 4-6, 2% Triton X-100, 1% Mercaptoethanol, 0,8 M urea) 6:4 arányban (minta:puffer) elegyítettük. A kialakított gélzsebeket kétszer mostuk, mivel hirtelen nagy mennyiségű urea oldódik ki a gélből a katód pufferbe. A mintákat Hamilton pipettával vittük fel.

A futtatás végén a gélből pengével kimetszettünk egy mintát tartalmazó körülbelül 4 mm széles sávot. A gélseletet ekvilibrációs pufferben (6 M urea, 30% glicerol, 0,1 M Tris-HCl pH 8,8, 0,0325 M DTT) 2 órán át, inkubáltuk, a puffert kétszer cseréltük.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

Az SDS-PAGE adta a kétdimenziós gélelektroforézis második dimenzióját. Az IEF-UREA végén kapott gélseleten fókuszálódott fehérjéket ebben a dimenzióban molekulasúlyuk szerint választottuk el (Schägger, 1987). A módszer lényege, hogy a denaturáló SDS körülveszi a fehérje molekulákat, melyek elveszítik natív konformációjukat, és egységes negatív felületi töltést kapnak, így futási sebességüket már csak molekulasúlyuk befolyásolja. Az eljárás alkalmas 1-200 kDa közötti fehérjék szeparálására.

Komponens	Stacking gél (végkoncentráció)	Szeparáló gél (végkoncentráció)
Akrilamid/Bisz-akrilamid (49.5%T, 3%C)	4%	10%
Gélpuffer (3 M Tris-HCl pH 8,5, 3,0% SDS)	0, 75 M Tris 0,075% SDS	1 M Tris 0,1% SDS
APS (10%)	0,056%	0,056%
TEMED	0,056%	0,056%
Glicerol (87%)	-	9,4%

3. táblázat: Az SDS gél összetétele

T (total): az akrilamid és bisakrilamid együttes koncentrációja;

C (crosslinker): a bisz akrilamid koncentrációja a T-ben

A gélek vastagsága 15 mm, a szeparáló gél 65 mm, míg a stacking gél 7 mm hosszú. A gél összetétele a 3. táblázatban leírtak szerint alakult:

Futtatás előtt a gélseleket 3mm-rel a stacking gél fölé csúszattuk, 4%-os agarózba ágyaztuk.

A katód puffer (pH=8,25) 0,1 M Tris-t, 0,1 M Tricint és 0,1% SDS-t tartalmazott, az anód puffer (pH=8,9) 0,2 M Tris-HCl oldat volt.

A géleket 200 V feszültséggel és 80 mA áramerősséggel futtattuk másfél órán át. Molekulasúly markerként Bio-Rad Kaleidoscope standardet használtunk. A géleken a fehérjéket ezüsfestéssel tettük láthatóvá.

Ezüsfestés

A festési eljárásban a képkötés alapja, hogy a változó pH hatására kicsapódó ezüst sók megkötődnek a fehérjék felületén. A nem kívánt háttér színeződés elkerülése érdekében többszöri mosás szükséges. (Blum, 1987)

Első lépésben desztillált vizes mosással eltávolítottuk a gélben maradt fixálószeret. Ezt egy érzékenyítő lépés követte, 1 perces kezelés 0,8 mM-os nátrium-tioszulfát oldattal. 1 perc mosás után összesen 100ml ezüst-nitrátot (1 ml) és formaldehidet (75 µl) tartalmazó oldattal 20 percen át festettük a géleket, majd megint 1 percig mostuk. Előhíváshoz 100 ml, 5g nátrium karbonátot, 50 µl formaldehidet és 2 µl nátrium-tioszulfátot tartalmazó oldatot használtunk. A fehérjék megjelenése után az előhívást 1%-os ecetsavval állítottuk le. A maradék vegyszerek és csapadékok eltávolítása érdekében a géleket hosszan mostuk desztillált vízzel az eljárás után.

Western blot analízis

A módszer lényege, hogy elektroforézist követően a kapott gél egyik oldalára membránt, vagy valamilyen filtert téve, a gél olyan elektromos térbe helyezünk, ahol a fehérjék a membrán felé mozognak, végül arra átkerülnek. Ezt az elektródák megfelelő elhelyezése biztosítja. A fehérjéket festési eljárással tehetjük láthatóvá a membránon. (Bennett, 1989, Cullimore, 1984)

Kísérleteinkben „Semi-dry” blottolást végeztünk, a fehérjéket PVDF membránon kötöttük meg. A blottolást Multiphore II (Pharmacia) típusú készülékkel, 50 mM-os

borát puffer (pH 9,0) alkalmazásával, 100 V feszültséggel, 50 mA (1 mA/cm²) áramerősséggel 90 percen keresztül végeztük (Pécsváradi, 2009).

A blottolás után a GS alegységeit festési eljárással kellett láthatóvá tenni a membránon. A membránon lévő nem specifikus kötőhelyeket blottonként 50 ml 5%-os albumin oldattal 2 órán át, enyhe rázatással blokkoltuk. Ez után a membránokat poliklonális GS-antitesttel kezeltük 2 órán át. A nem kötött antitesteket 35 perces mosással távolítottuk el (30 perc TTBS oldatban: TBS, desztillált víz, TWEEN 20, majd 5perc TBS oldatban: 0,2 M Tris bázis, 1,5 M NaCl). Következő lépésben a membránokat 1 órán át másodlagos antitesttel, alkalikus foszfátázzal konjugált Protein-A-val kezeltük (Pécsváradi, 2009). Ezt 30 perc TTBS, majd 30 perc TBS oldatos mosási lépés követte. A membrán 5 percre előhívó pufferbe (DB-developing buffer: 1 M Tris bázis, 1 M NaCl, pH 9,0) helyeztük, melyhez BCIP-t és NBT-t adtunk. Az utóbbi két vegyület az alkalikus foszfátázzal reagálva lila csapadékot hoz létre. A fény hatására könnyen elbomló, érzékeny festékanyagok miatt az előhívást zárt edényben, sötétben kell végeznünk. A színreakció csak ott játszódik le, ahol a membránon a GS-hez hozzákötött az alkalikus foszfátáz a poliklonális GS antitesten keresztül.

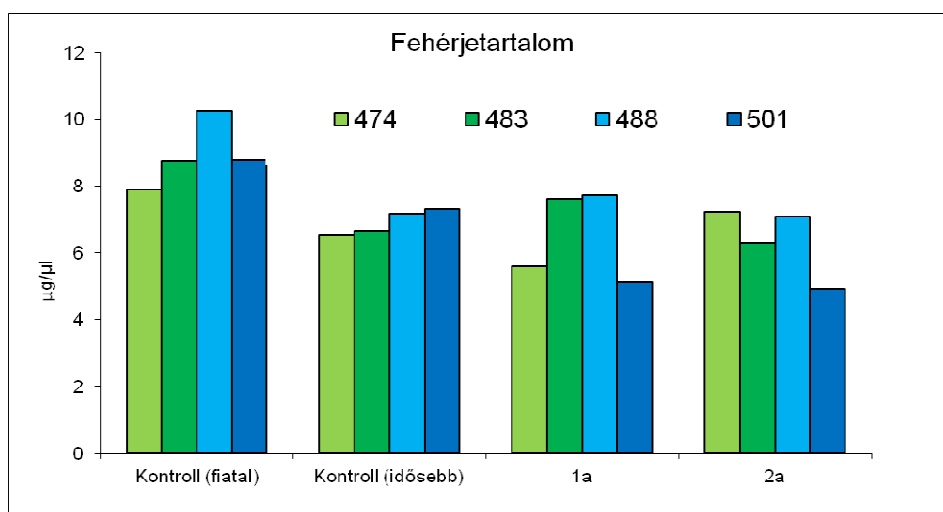
Eredmények és értékelésük

Fehérjetartalom mérések

A fehérjetartalom mérésekhez a frissen kinyert primer fehérje extraktumot használtuk fel, így elkerülhető a fehérjetisztítás, a kicsapás és visszaoldás következményeként előforduló esetleges fehérjevesztés. A méréseket Bradford módszerével hajtottuk végre.

A tanulmányozott mintáink a fiatalabb és idősebb kontroll növények mellett *F. culmorum*-mal (1a) és *F. graminearum*-mal (2a) fertőzött növényekből származtak. Az idősebb kontroll 1a és 2a minták egykorúak. A 4. ábrán feltüntetett eredményeket kezelésként 1-1 levél fehérje extraktumából mértük, szórást emiatt nem ábrázolhattam.

Az idősebb kontroll mintáknál megfigyelhető az öregedéssel járó fehérjemennyiség csökkenés. Az oldható fehérje koncentráció eltérően alakult a különböző fertőzéseknel az egyes búza genotípusoknál. A 483 és 488 vonalak fehérjetartalma nem tért el jelentősen az idősebb kontroll mintától. A 474 típus *F. culmorum* fertőzésre érzékenyebben reagált, fehérjetartalma lecsökkent, viszont *F. graminearum* kezelésnél a kontroll mintáéhoz hasonló eredményt kaptunk. Az 501-es mintánál ilyen különbség nem tapasztalható.



4. ábra: A minták oldható fehérjetartalma
474, 483, 488, 501: búzavonalak. 1a: *F. culmorum* kezelt minták.
2a: *F. graminearum* kezelt minták (egyedi levelek).

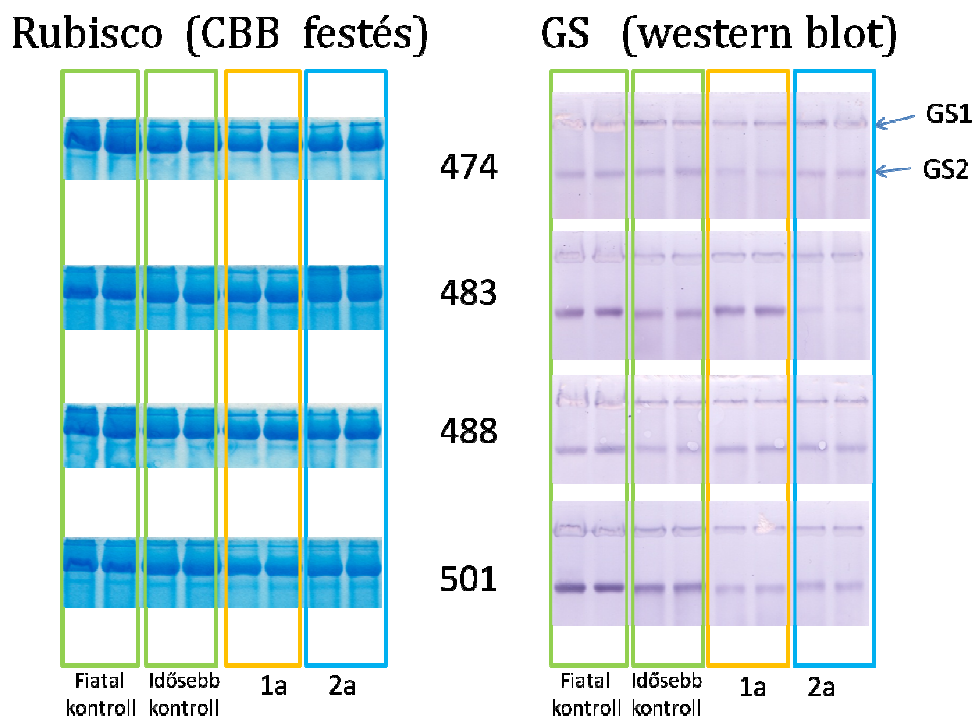
Natív gélelektroforézis

Bár a natív géleket futtatás után Western blot analízishez használtuk fel, a Rubisco elég nagy fehérje, és elegendő mennyiségben van jelen ahhoz, hogy a másfél órás blottolás után is viszonylag nagy mennyiség maradjon belőle a gélben. A gél blottolás után Coomassie Brilliant Blue festésnek vetettük alá.

A géleket szkennelve és a megfelelő sávokat egymáshoz illesztve akár szemrevételezéssel is összevethetjük az egyes minták Rubisco tartalmát.

Megfigyelhető, hogy az idősebb kontroll és a kezelt minták esetében a Rubisco sávja valamivel gyengébben rajzolódik ki, mint a fiatal kontroll minták estén. A sávokat elhalványulása összhangban van a fentebb bemutatott mért fehérjetartalommal, tehát a fehérjemennyiség megváltozásához a Rubisco lebomlása is hozzájárult.

A Rubisco mennyiségének csökkenése a kloroplasztisz degradációját jelzi. Az eredményeket az 5. ábra mutatja.

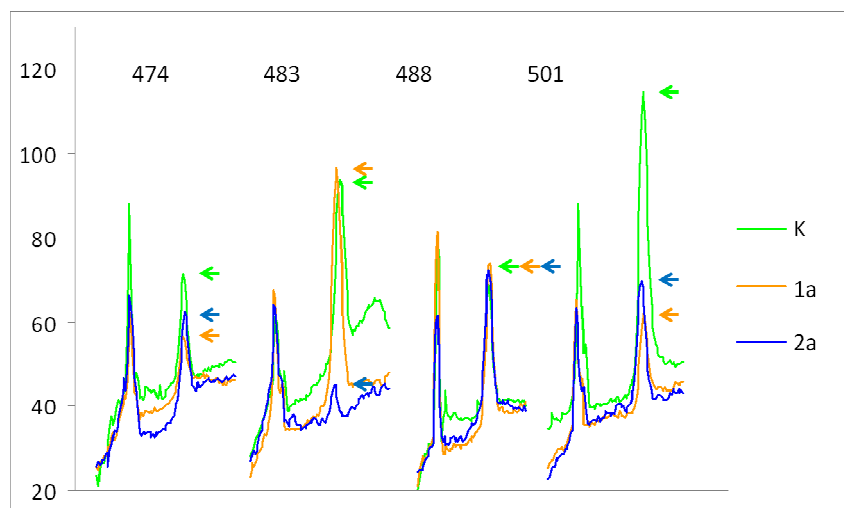


5. ábra: A Rubisco sávjai natív gélen, western blot után (balról). Western blot analízis: GS1 és GS2 izoenzimek PVDF membránon, blottelőhívás után (jobbról). 474, 483, 488, 501: búzavonalak.. 1a: *F. culmorum* kezelt minták. 2a: *F. graminearum* kezelt minták (egyedi levelek).

Western blot analízis

A natív géleket tovább vittük Western blotra, hogy a membránon megkötött fehérjék közül a láthatóvá tegyük a citoplazmatikus GS1 és a plasztidikus GS2 izoformákat (5. ábra).

A citoplazmatikus GS1 esetében nem tapasztaltunk drámai eltéréseket, a GS2-nél viszont már más a helyzet. A GS2 mennyisége szeneszcencia hatására lecsökken. Fertőzés hatására a csökkenés szembeötlő az 501 jelzésű búza genotípusnál. A 474 és 488-as minták GS2 tartalmukban hasonlóan alacsony mennyiséget mutatnak. A legdrasztikusabb GS2 szint csökkenés a *F. culmorum* fertőzött 483 2a mintánál látható. A *F. graminearum* kezelt 483 1a esetén viszont a GS2 mennyisége meghaladja a fiatal kontrollnál detektálható szintet is.



6. ábra: GS Western blot denziás plot. K: idősebb kontroll, 1a: *F. culmorum* kezelt minták, 2a: *F. graminearum* kezelt minták. Az első csúcsok: GS1 polipeptid, a nyilakkal jelölt második csúcsok a GS2 polipeptid mennyiségét jelzik.

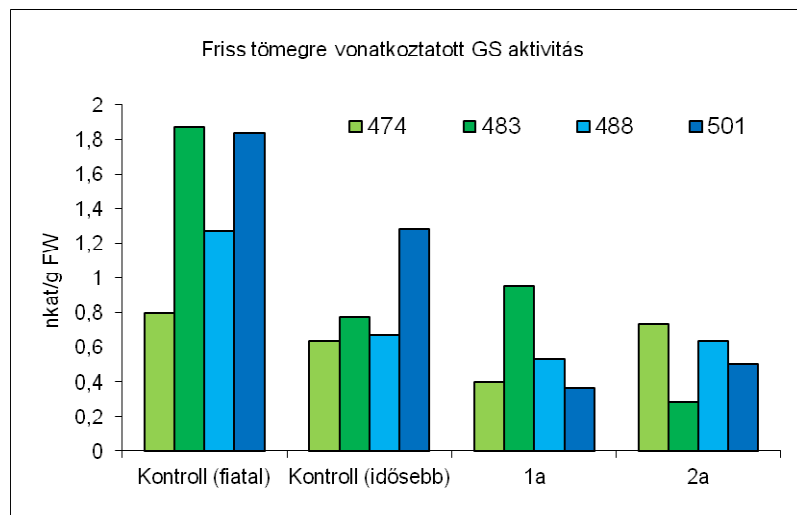
A GS2 mennyiségének csökkenése szintén a kloroplasztiszból zajló autofág folyamatok beindulására utal. Tehát az alacsonyabb Rubisco, és GS2 szint a kloroplasztisz degradációjának, és az anyagcsereviszonyok átrendeződésének eredménye. Az, hogy a GS1 szint állandó, vagy kis mértékben növekvő tendenciát mutat, a citoplazma, és a mitokondrium intaktaságát jelzi. Vagyis az autofág folyamatok még nem érintik az utóbbiakban említett celluláris tereket a fertőzés korai stádiumában, míg a kloroplasztisz már elszorítja a biotikus stressz okozta károkat.

In vitro glutamin-szintetáz aktivitás

Az aktivitásméréshez a primer fehérje extraktumot használtuk fel, megőrizve a glutamin-szintetáz enzim aktivitását. A GS teljes aktivitásához a GS2 jóval nagyobb mértékben járul hozzá, mint a GS1. Emellett fentebb igazoltuk, hogy a GS1 mennyisége a kísérleteinkben vizsgált búzalevelekben csaknem állandó, így a mérési eredmények (7. ábra) elsősorban a plasztidikus GS2 aktivitásáról adnak információt.

A 474 vonal GS aktivitásában jelentős változás csak *F. graminearum* fertőzés hatására jelentkezett, míg az 501-es növénynél fertőzés hatására alacsony aktivitást mértünk.

A 483 növények a különböző fertőzésekre eltérő GS aktivitást mutattak. Jóval alacsonyabb GS aktivitást mértünk *F. culmorum* fertőzésre, mint *F. graminearumra*.



7. ábra: A glutamin-szintetáz aktivitása friss tömegre vonatkoztatva 474, 483, 488, 501: búzavonalak. 1a: *F. culmorum* kezelt minták. 2a: *F. graminearum* kezelt minták (egyedi levelek).

Az egyes mintáknál kapott aktivitásváltozások összhangban vannak a western blotton látható GS2 szintekkel. A *Fusarium* kezelt mintáknál tapasztalt GS2 szint és aktivitás, valamint a Rubisco mennyiség csökkenése, együttesen a kloroplasztisz degradációját jelzik. Mindezek az eredmények és a mért alacsonyabb fehérje koncentrációk egybevágóan a fertőzés okozta korai levél szeneszenciára utalnak.

Kétdimenziós gélelektroforézis

A módszer a fehérjék sokkal finomabb elválasztását teszi lehetővé, mint amit az egy dimenzióban végzett elektroforetikus módszerek felbontása megenged. A fehérjekivonat tisztasága, a gélek pórusmérete, az alkalmazott festési eljárás mind hozzájárulnak a végeredmény értékelhetőségéhez. A módszerek megfelelő kombinációjával sikerült kidolgoznunk egy olyan kétdimenziós elválasztási metódust, amely alkalmas a *Fusarium* kezelt minták összehasonlító elemzésére.

A vizsgálatokhoz tisztított fehérje extraktumot használtunk. Izelektromos fókuszálás után a kapott gélből gélseleteket vágunk ki a fehérjék futási irányának orientációjában. A kimetszett gél darabokat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább. A gélseleteket 90°-kal elfordítva, a rajtuk lévő fehérjéket molekulasúlyuk szerint választottuk el. Az SDS géleket ezüsfestésnek vetettük alá.

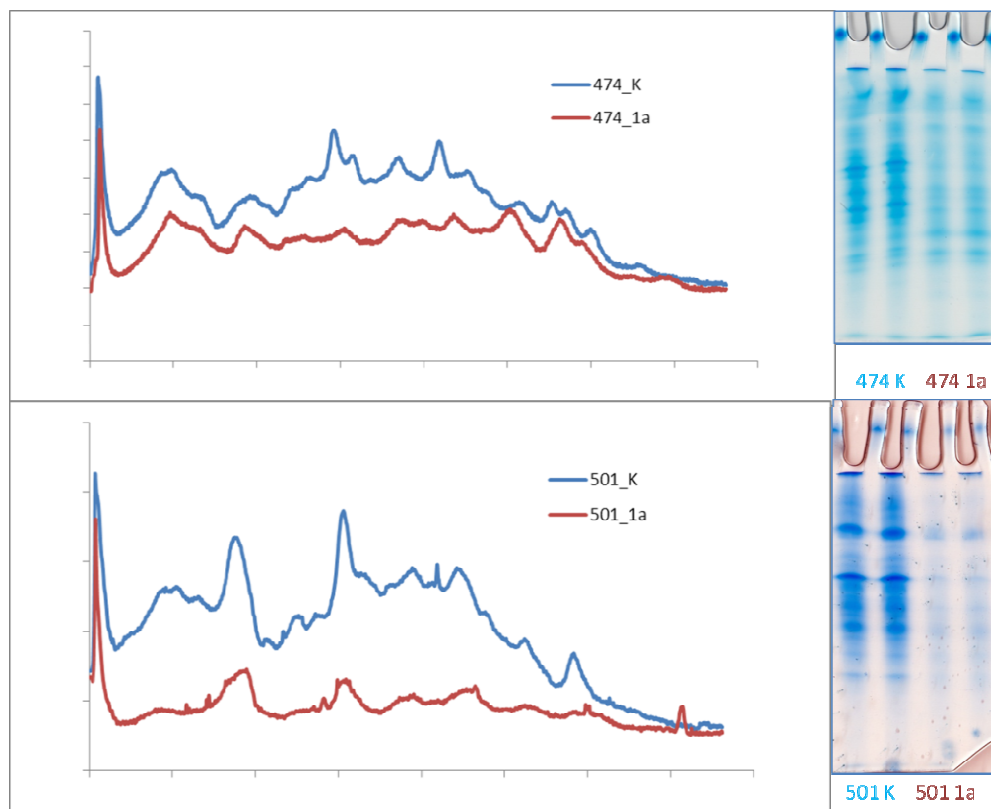
Denaturáló izoelektromos fókuszálás

Denaturáló izoelektromos fókuszálással a fehérjéket pH 3,2-10,5 tartományban választottuk el, azok izoelektromos pontja szerint. A futtatás során kialakuló pH grádiens miatt a magasabb izoelektromos ponttal rendelkező fehérjék a lúgosabb tartományban, a gélzsebek felől, míg az alacsonyabbal rendelkezők a savas tartományban, a gél aljánál találhatók. A fehérjesávokat Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá.

A gélképek pixelintenzitásának analíziséhez Scion Image programot használtunk. A kapott adatokat Microsoft Excel 2010 program segítségével jelenítettük meg grafikonban. Eredményeinket a 8. ábra mutatja be.

Az izoelektromos fókuszálás végére igen éles sávokat kaptunk. Ez alapján feltételeztük, hogy a kialakított eljárás alkalmas arra, hogy egy kétdimenziós elválasztás első dimenziójaként alkalmazzuk. A kapott gélképek és denzitogramok is tükrözik a módszer alkalmasságát a *Fusarium* fertőzött minták összehasonlító analízisére.

A módszer tesztelésére az idősebb kontroll és a *F. culmorum*mal kezelt búza levelekből származó mintákat választottuk. A denzitogramok görbéinek összehasonlításán már jól látszik a *Fusarium culmorum* fertőzés hatására fellépő fehérje készlet átrendeződés.



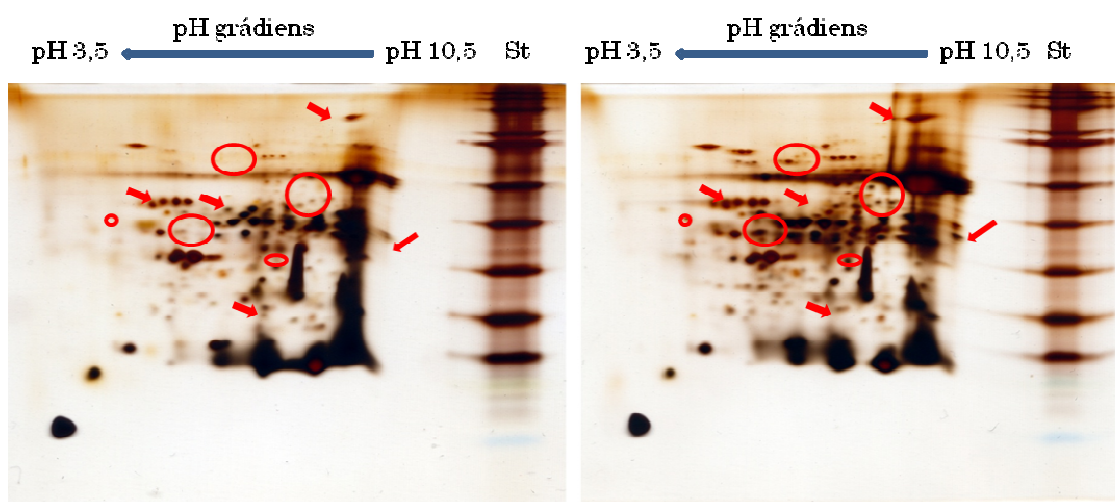
8. ábra: *Fusarium* rezisztens búzafajták vizsgálata.
 Az izoelektromos fókuszálás eredményeként kapott géleképek (jobbról)
 mellettük a hozzájuk tartozó denzitogram (balról). 474, 501: búzafajták.
 K: idősebb kontroll növény. 1a: *Fusarium culmorum* kezelt minták.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A denaturáló izoelektromos fókuszálás során kapott gélből kimetszett gélseletet használtuk fel. A fehérjéket molekulasúlyuk szerint választottuk el. A géleken lévő fehérjéket ezüstoffestéssel tettük láthatóvá.

Az eljárás végén kapott géleken a fehérjék zöme jól meghatározható foltban helyezkedik el. A foltok jól körülhatárolhatók, szélük éles. A módszer megfelelő degradálódó fehérjekészlet analízisére, amely a *Fusarium* fertőzött minták részletesebb vizsgálatához is szükséges. Ilyen részletes fehérjemintázatról alkotott képek alkalmasak a fehérje összetétel mélyrehatóbb vizsgálatára, összehasonlító elemzésekre. A protokoll szigorú követése jól ismételhető eredményeket ad. Az SDS gél akrilamid koncentrációja pedig tetszőlegesen változtatható aszerint, hogy mely molekulasúly tartományban szeretnénk vizsgálni. A nagyobb méretű molekulák egy porózusabb, hígabb, alacsonyabb akrilamid tartalom mellett szebben válnak el, míg a kisebb proteinekre éppen ennek ellenkezője igaz.

További terveim közt szerepel a kidolgozott módszer felhasználása a *Fusarium* fertőzés által okozott hatások felderítésére, az egyes fajták eltérő reakcióinak mélyebb értelmezésére. Későbbi kutatásaim során a kétdimenziós elválasztást, és festési eljárásokat tovább szeretném finomítani.



9. ábra: Kontroll (balról) és stressz kezelt (jobbról) búza fehérje minták kétdimenziós elválasztása. St: molekulasúly marker (Felülről lefelé haladva a marker a 250, 180, 130, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 11 kDa-os sávokat jelöli)
A mintázat lényegesebb eltérései vörössel jelölve.

A vizsgált búza növények érzékenysége

A plasztidikus GS2 szint csökkenése a szenescencia kezdetét jelzi. A kloroplasztisz degradálódása a *Fusarium* fertőzés hatására indul meg. A gombafonalak bejutása a növényi szövetekbe, azok növekedése, toxintermelése hatással van a búza növényre. Az anyagcsere a fogékony fajták zászlóslevelében a lebontási folyamatok irányába tolódik el, a továbbiakban katabolikus forrásként funkcionálva. Ezzel ellentétben a toleráns fajtáknál megmarad az aktív asszimiláció a zászlóslevélben.

A glutamin-szintetáz aktivitásgátlásának mértéke a toleranciaszint vizsgálatának alkalmas paramétere. Figyelembe véve ezt, és a fentebb részletesen ismertetett eredményeinket (fehérjetartalom, a Rubisco mennyisége, a glutamin-szintetáz izoenzimeket érintő változások) arra jutottunk, hogy a búzavonalak toleranciája a fertőzéseknel eltérően alakul. Az egyes fertőzéseknel a búza genotípusok tolerancia szint szerinti csökkenő sorrendje: *F. culmorum* - 501>>474≥488>>483; *F. graminearum* - 483≥501>>>474=488.

Búzavonalak	A GS aktivitás gátlása (%)	
	<i>Fusarium</i> törzsek	
	1a	2a
474	37	nincs
483	nincs	63
488	21	nincs
501	71	60

4. táblázat: Az *in vitro* glutamin-szintetáz aktivitásgátlás összegzése (az idősebb kontroll mintához viszonyítva).

Összefoglalás

A glutamin szintetáz (GS, EC 6.3.1.2) a nitrogén anyagcsere egyik kulcsenzime. A nitrát redukcióból, fotorespirációból származó, valamint a talajoldatból felvett szervesetlen ammóniumionokat energia befektetéssel glutaminba építi be. Az enzimnek mind a nitrogén asszimilációjában, mind a reasszimilációjában fontos szerepe van.

A fehérjék aminocsoportjai kiváló nitrogénraktárak, így a Rubisco, mint az egyik legnagyobb növényi fehérje, degradációjával jelentős mennyiségű nitrogén szabadítható fel. Stressz hatására a fehérjék degradálódhatnak, lebomolhatnak, megváltozhat a nitrogén anyagcsere enzimek aktivitása és mennyisége.

Dolgozatomban a *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzés hatására fellépő glutamin szintetáz izoenzimeket, fehérjetartalmat tanulmányoztam búza zászlóslevélben. Megvizsgáltam a búza levélben fellelhető citoplazmatikus és plasztidikus GS izoenzimek összaktivitás változását *in vitro* aktivitás vizsgálattal és a GS polipeptidek mennyiségének alakulását western blot analízissel. Emellett sikerült kidolgozni egy olyan protokollt, amely alkalmas a *Fusarium* kezelt minták kétdimenziós fehérjemintázat változásainak összehasonlító analízisére.

A GS teljes aktivitása a fertőzött növényekből származó minták esetében szignifikánsan csökkent, valamint a western blot eredményei a GS2 izoforma mennyiségi csökkenését mutatták.

A fehérjetartalom mérésekben is kisebb oldható fehérje mennyiséget kaptunk, ami összhangban volt a natív gélen látható Rubisco bendjének csökkent denzitásával.

A GS csökkent aktivitása, az alacsony GS2 és Rubisco mennyiség, valamint a csökkent fehérjetartalom, a kloroplasztisz degradációját, az anyagcsereviszonyok megváltozását, a felgyorsult szeneszenciát jelzik az adott fertőzésre érzékeny genotípusokban. Míg a citoplazma és a mitokondriumok szinte zavartalanul betölthetik funkciójukat a még zöld zászlóslevélben, addig a szelektív autofág folyamat beindulását már mutatja a GS2 polipeptidek érintettsége.

Eredményeink alapján a búza fajták érzékenysége eltérő a különböző *Fusarium* törzsek által okozott fertőzések esetén, melynek jó indikátora lehet a GS2 izoenzim állapota a zászlós levélben.

Felhasznált irodalom

- Arya A., Perelló E. A. (2010) Management of Fungal Plant Pathogens. ISBN 9781845936037
- Bennett M. J., Cullimore J. V. (1989) Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* 179: 433–440
- Biesiadka J., Legocki A. (1997) Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. *Plant Science* 128: 51–58.
- Blanco L., Reddy P. M., Silvente S., Bucciarelli B., Khandual S., Alvarado-Affentrenger X., Sánchez F., Miller S., Vance C., Lara-Flores M. (2008) Molecular cloning, characterization and regulation of two different NADH-glutamate synthase cDNAs in bean nodules. *Plant, Cell and Environment* 31: 454–472
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987) Improved silver staining of proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bradford M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brandfass C., Karlovsky P. (2006) Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 4., doi:10.1186/1471-2180-6-4
- Cullimore J.V., Miflin B.J. (1984) Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant forms of enzyme from *Phaseolus vulgaris* root nodules. *J Exp Bot* 35: 581–587

- Eisenberg D., Gill H. S., Pfluegl G. M. U., Rotstein S. H. (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* 1477 (1-2): 122-45
- García-Domínguez M., Reyes S. J. C., Florenico J. F. (1997) Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 244: 258-264
- Hirel B., Gadal P. (1980) Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol* 66: 619-623
- Kamachi K., Yamaya T., Mae T., Ojima K. (1991) A Role for Glutamine Synthetase in the Remobilization of Leaf Nitrogen during Natural Senescence in Rice Leaves. *Plant Physiol.* 96, 411-417
- Laemmli U. K. (1990) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Layzell, D. B. 1990. N_2 fixation, NO_3^- reduction and NH_4^+ assimilation. pp. 399-406. In: *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*. (Eds. Dennis, D. T., Turpin, D. H.), Longman House, Harlow, England. ISBN 0-582-46052-2
- Lea P. J. (1997) Primary nitrogen metabolism. pp: 273-306. In: *Plant Biochemistry* (Eds. Dey P. M., Harbone J. B.). Academic Press, London
- McNally S. F., Hirel B. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Veg.* 21: 761-774
- McNally S. F., Hirel, B. Gadal, P, Mann A. F., Stewart G. R. (1983) Glutamine Synthetases of Higher Plants. *Plant Physiol.* 72: 22-25
- Pécsváradí A., Nagy Z., Varga A., Vashegyi Á., Labádi I., Galbács G., Zsoldos F. (2009) Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. *Physiologia Plantarum* 135: 43-50

- Prashanth B. G., Manvendra S. K., (2011) Role of chloroplastidial proteases in leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior* 6:9, 1371-1376
- Schägger H., von Jagow G., (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.
- Storey R., Beevers L. (1978) Enzymology of Glutamine Metabolism Related to Senescence and Seed Development in the Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 61: 494-500
- Tsuprun V. L., Samsonide T. G., Radukina N. A., Pushkin A. V., Evstigneeva Z. G., Kretoich W. L. (1980) Electron microscopy of glutamine synthetase from pea leaf chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 626: 1-4
- Turner SL, Young J. P. (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol.* 2: 309-19.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Tari Irma tanszékvezetőnek a lehetőségért, hogy szakdolgozatomat a SZTE TTIK Növénybiológia tanszékén készíthettem.

Hálával tartozom a Gabonakutató Intézet munkatársainak a felhasznált minták biztosításáért.

Köszönet témavezetőmnek, Dr. Pécsváradi Attilának, gyakorlati és elméleti tanácsaiért, türelméért, a pályamunka megírásához nyújtott minden segítségéért.

Szeretném megköszönni Nagy Zoltánnak a labormunkához nyújtott segítségét.

Nyilatkozat

Alulírott Németh Edit (EHA kód: NEEMAAT.SZE), Biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a pályamunkámban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Aláírás:

Kelt.: Szeged, 2012. április 16.