



---

Élelmiszertudományi Kar

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK  
VIZSGÁLATA AZ ÁRPÁBAN PROTEOMIKAI  
MÓDSZEREKKEL**

**Süle Andrea**

**Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Budapest**

**2008**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola


**tudományága:** Élelmiszertudományok


**vezetője:** Dr. Fodor Péter  
egyetemi tanár, DSc  
Budapesti Corvinus Egyetem

**Témavezető:** Dr. Hajós Gyöngyi<sup>†</sup>  
Osztályvezető, DSc  
Táplálkozástudományi Osztály  
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Dr. Hoschke Ágoston  
Egyetemi tanár, CSc  
Sör- és Szeszipari Tanszék  
Élelmiszertudományi Kar  
Budapesti Corvinus Egyetem

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

  
.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

  
.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. BEVEZETÉS

A 21. században a gabonanövények két milliárd tonna éves terméshozamukkal a legfontosabb terményeink közé tartoznak, melyek közül az árpa a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett növény világszerte. Az árpa 10000 évvel ezelőtt terjedt el a Közel-Keleten, és azóta is állatok takarmányozására, sör, illetve kisebb mennyiségben ételek készítésére használják.

Az árpa is - mint bármely más termesztett növény - élete során folyamatosan ki van téve olyan biotikus és abiotikus hatásoknak, amelyek jelentősen befolyásolják fejlődését, növekedését, és meghatározzák produktivitását. Abban az esetben, ha a környezeti feltételek az adott faj igényeinek megfelelő optimumértékeken kívül esnek (túl alacsony, illetve túl magas hőmérséklet, kiegyenlítetlen ásványi anyag ellátás, nem megfelelő fényviszonyok, vízhiány stb.), a növény élettani stresszhelyzetbe kerül. Hazánkban a különböző környezeti, abiotikus hatások (főként szárazság) következtében a gabonafajtáink a bennük rejlő termőképességnek átlagosan csak a felét tudják produkálni, ami jelentős gazdasági veszteséget jelent. Természetesen ezért olyan abiotikus és biotikus stresszhatásokkal szemben ellenálló fajták nemesítése a cél, amelyekkel a gazdasági károk is csökkenthetők.

A fenti előzményekből kiindulva doktori munkám során célul tűztem ki, hogy proteomikai módszerekkel (2-DE, MS) megvizsgáljam a hazai körülmények között termesztett és a környezeti stresszhatásokra érzékeny 'Jubilant', illetve ezen hatásokra kevésbé fogékony 'Mandolina' sörárpák fehérjéinek expressziós változását, amelyet a magas hőmérséklet, a kadmiumszennyezettség és az eltérő termesztési körülmények okoznak. A stresszhatások fehérjék szintjén történő vizsgálata azért is kiemelt fontosságú, mert a transzkriptomban kimutatott stresszválaszok körülbelül 20%-ához tartozó expressziós szekvenciárszletek (EST) funkciója még ismeretlen, így a proteomban megvalósuló jeltovábbítás, szabályozás, enzimatis aktivitás és szerkezeti funkciók megismerése közvetlenül a proteom szintjén válik lehetővé.

A különböző stresszhatásokkal szembeni védekezésben a stressz hatására indukált molekulák közül a stresszfehérjéknek nagyon nagy szerepük van, hiszen hozzájárulnak az egyes stresszhatásokkal szembeni ellenálló képesség fokozásához. Így a

stresszválaszokban részt vevő fehérjék azonosítása elengedhetetlen a táplálékláncunkba való bekerülésük kockázata miatt. Ezt látszik alátámasztani az a tény, hogy az elmúlt években proteomikai módszerekkel nagy számban izoláltak és karakterizáltak élelmiszereinkből növényi eredetű allergéneket, melyek között a növényi védekezésben részt vevő fehérjék is jelen voltak.

A védekezésében részt vevő fehérjék felkutatása mellett részletesebb képet kívántam felvázolni arról is, hogy a különböző abiotikus stresszhatások miként befolyásolják élelmiszeripari nyersanyagaink fehérje-összetételét.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során proteomikai módszerek alkalmazásával célul tűztem ki:

1. Három különböző árpafajta ('Jubilant', 'Bivoy', 'Mandolina') levélsírájából származó karbamid oldódó kétdimenziós fehérjemintázatok összehasonlítását és vizsgálatát, illetve annak kutatását, hogy a környezeti stresszhatásokra érzékeny ('Jubilant') és ugyanezen stresszhatásokra rezisztens ('Mandolina') árpafajták levélsírájának kétdimenziós fehérjemintázata hogyan változik rövid ideig tartó nagy hőhatás következtében.
2. A 'Jubilant' tavaszi árpafajta karbamid-oldható fehérje-összetétel – eltérő termesztési körülmény hatására bekövetkező - változásának nyomon követését.
3. Annak proteomikai vizsgálatát, hogy a különböző koncentrációjú (200  $\mu\text{M}$  és 1 mM  $\text{CdCl}_2$ ) kadmiumkezelések miként hatnak a 'Jubilant' árpafajta levélsírájából kivont karbamid-oldódó fehérjékre..
4. Két különböző évjárat hatásának ellenőrzését három különböző árpafajta ('Jubilant', 'Bivoy', 'Mandolina') szemterméséből származó víz-só oldható fehérjék kétdimenziós mintázatára.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### A vizsgált minták:

Felhasznált tavaszi kétsoros *Hordeum vulgare* sörárpafajták a Szegedi Gabonatermesztési Közhasznú Társaság Intézet táplánszentkereszti Növénynevelési Kutató Állomásáról származtak.

'Jubilant': Az 1990-es évek második felében a legnagyobb területen termesztett szlovák sörárpa. Magyarországon 1993-ban kapott állami elismerést. Termőképessége jó, bár a környezeti anomáliákra érzékenyen reagál. Söripari minősége kiváló. Magyarországon a legnagyobb vetésterületű sörárpafajta.

'Bivoy': A legtermőképesebb, kiváló alkalmazkodóképességű német sörárpafajta. Szárazságtűrő. Magyarországon 2002-ben kapott állami elismerést.

'Mandolina': Kiváló termőképességű, szárazságtűrő, alacsony fehérjetartalmú holland sörárpafajta. Magyarországon 1998-ban kapott állami elismerést. Az országos szortiment legalkalmazkodóképesebb tavaszi árpája.

#### Az árpafehérjék kioldása:

A fehérjemintákat az árpanövény két különböző részéből: a levélcsírából és a szemtermésből nyertem ki.

A kadmiummal és hőstresszel kezelt levélcsírákból a fehérjéket először egy triklórecetsavas (TCA) oldattal csaptam ki, az izoelektromos fókuszálást zavaró komponenseket (pl. polifenolok, sók, növényi pigmentek) pedig acetonnal távolítottam el. A TCA-val kicsapott fehérjék feloldására karbamid-alapú lízis puffert használtam. A különböző termesztési körülmények az árpa szemtermés proteomjára gyakorolt hatását is a karbamid-oldódó fehérjék szintjén vizsgáltam.

Az évjáratok hatásának ellenőrzésekor a három árpafajta szemtermésének a 2,5 mm-nél nagyobb - malátagyártásra felhasznált - szemeiből 0,1M NaCl oldattal vontam ki a

víz-só oldható fehérjéket. Ilyen módon a metabolikusan aktív albumin és globulin fehérjéket vizsgáltam tovább.

### Fehérjék elválasztása

Egydimenziós gélelektroforézis:

A kapott fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztása nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid gélen Mini Protean II (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) rendszer felhasználásával történt. A géleket Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel festettem.

Kétdimenziós gélelektroforézis:

Az egyes fehérjeminták izoelektromos pont szerinti szeparálását Multiphor II (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), vagy PROTEAN IEF cell (Bio-Rad) készülékekben végeztem. A molekulatömeg szerinti elválasztás SDS-tartalmú gélekben Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad), vagy PROTEAN II XL multi-cell (Bio-Rad) készülékekben zajlott. A géleket Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel festettem.

Gélek kiértékelése:

A géleket 12-bit GS-710 kalibrált denzitométer (Bio-Rad) segítségével fényképeztem és PDQuest 7.1 softverrel (Bio-Rad) értékeltem ki. Az összepárosított fehérjefoltok optikai denzitásának relatív mennyiségét kétmintás t-próba segítségével értékeltem ki és azon fehérjefoltokat vizsgáltam tovább tömegspektrometriával, melyek  $p < 0,05$  valószínűségi szinten tértek el mennyiségileg egymástól.

### Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével

A fehérjék azonosítása a Ghenti Egyetem Fehérje Biokémiai és Fehérje Mérnökségi Laboratóriumában és a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Vegytani Intézetében zajlott az alábbi készülékek felhasználásával: Bruker Reflex III MALDI-TOF MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany), MALDI TOF/TOF MS

(Applied Biosystems, Framingham, CA, USA) és ESI-Q-TRAP MS (Applied Biosystems).

Az árpa genomszekvenciája még nem feltárt, de az eddig árpával kapcsolatban rendelkezésre álló expressziós szekvenciárészletek (EST) nagyban segítettek egyes fehérjék azonosítását, hiszen a megszekvenált peptidfragmensek lefordításával kapott EST-szekvenciával EST-adatbázisban bővíthetem a lekeresést, melyet a BLAST-keresőprogrammal is kiegészítettem. Néhány esetben peptidtömeg ujjlenyomat (PMF) alapján is sikerült fehérjéket azonosítanom.



#### 4. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során proteomikai módszerekkel (2-DE, MS) megvizsgáltam a sörárpák fehérjéinek a különböző abiotikus stresszhatások miatt bekövetkező expressziós változását, mint amilyen a magas hőmérséklet, a különböző termesztési körülmények, a kadmiumszennyezettség és a szárazság. A védekezésében részt vevő fehérjék megismerése mellett sikeresen mutattam be, hogy ezek a stresszhatások miként befolyásolják élelmiszeripari nyersanyagaink fehérje-összetételét. Proteomikai vizsgálataim fényt derítettek arra, hogy a különböző árpafajták fehérje-összetétele a környezeti stresszhatások következtében jelentősen módosul. A kétdimenziós elektroforézist eredményesen alkalmaztam tömegspektrometriával kombinálva, annak ellenére is, hogy az árpa genomszekvenciája még csak részben ismert. A legtöbb különbséget mutató fehérjét tudtam azonosítani a különböző MS-technikák MS vagy MS/MS módban való működtetése révén.

A munkám első felében a környezeti stresszhatásokra érzékeny ('Jubilant') és ugyanezen stresszhatásokra rezisztens ('Mandolina') árpafajták levélcsírájának kétdimenziós fehérjemintázatát hasonlítottam össze, és a 'Mandolina' fajtában a SAM-S enzim egyik izoformját detektáltam, mely a 'Jubilant' környezeti anomáliákra érzékeny fajtában nem volt kimutatható. A SAM-S ezen izoformjának expresszióját emellett a 'Bivoy' fajtában is kimutattam. A 'Jubilant' és 'Mandolina' árpafajták rövid ideig tartó hőmérsékleti stresszhatásra adott válaszreakciójának vizsgálatakor számos kis moltömegű hősokkfehérje és ezek izoformjainak képződése is megfigyelhető volt.

A kísérleteim további részében azt követtem nyomon, hogy a 'Jubilant' tavaszi árpafajta szemtermésében miként változik a karbamid-oldható fehérje-összetétele a különböző talaj-előkészítési és termesztési körülmények hatására. A különböző termesztési körülmények nyomon követése során számos, a külső körülmények hatására megváltozott expressziót mutató fehérjét sikerült azonosítani (22,0 kDa (IV család) hősokkfehérje prekuzort, a GroEL hősokkfehérjét, peroxidáz enzimet, glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz három izoformját). A kísérletben bemutattam, hogy az adott termesztési körülmény nemcsak elősegítheti vagy gátolhatja az egyes fehérjék expresszióját, hanem megváltoztathatja a fehérjék mennyiségét (koncentrációját), és

poszttranszlációs módosulást (PTM) is okozhat. Az egyes fehérjék több pozícióban történő megjelenése utalhat: az izoformok eltérő szerepére, a különböző szemtermés alkotók különböző izoform regulációjára és a nehezített termesztési körülmény hatására bekövetkező poszttranszlációs módosulásra.

A különböző koncentrációjú 200  $\mu\text{M}$  és 1 mM kadmium-klorid kezelések hatása a 'Jubilant' árpfajta levélcsírájából származó fehérjék kétdimenziós fehérjemintázatán úgy mutatkozott meg, hogy a kontroll mintához viszonyítva a RuBisCO nagy alegységének mennyisége csökkent. Ezen kívül a kadmium-klorid hatásaként az oxigénfelszabadítást fokozó fehérje (OEE2) expressziójának csökkenése is látható volt. Az eredményeimet irodalmi adatok is alátámasztják.

Az abiotikus stresszhatásokra eltérő expressziót mutató fehérjék további mélyrehatóbb vizsgálata iránymutatásul szolgálhat egy hatékonyabb rezisztencia nemesítés felé. Ez a megközelítés stresszhatásra indukálódó, de még ismeretlen funkcióval rendelkező gének pontos szerepét tisztázhatja, továbbá hozzájárulhat a növényi védekezési rendszer jobb megértéséhez is. A jövőben az abiotikus stresszekkel szembeni rezisztencia kutatásában a vizsgálatok nagyobb számú környezeti stresszekre érzékeny és azokra rezisztens árpfajtákkal való kiterjesztése mindenképpen szükségessé válik, mely a SAM-S detektált izoformjának pontos szerepét is tisztázhatja a stresszhatások alatt.

## 4.1 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam, hogy a környezeti stresszhatásoknak ellenálló 'Mandolina' és 'Bivoy' árpában is detektálható a SAM-S enzim egy olyan izoformja, mely a 'Jubilant' környezeti anomáliákra érzékeny fajtában nem mutatható ki. Az eredményem alapján azt a következtetést vontam le, hogy ennek az izoformnak a hiánya is közrejátszhat a 'Jubilant' árpafajta környezeti hatásokkal szembeni érzékenységében.
2. A 'Jubilant' és 'Mandolina' árpafajták hőmérsékleti stresszhatásra adott válaszreakciójának vizsgálatokor megállapítottam, hogy számos kis moltömegű hősokkfehérje (16,9 kDa, 17,8 kDa, sHSP) képződött a stresszhatás következtében, melyek nagy homológiát mutattak a rizs és a búza hősokkfehérjéivel. A hősokkfehérjék több izoformában is detektálhatóak voltak és expressziós különbséget mutattak a két árpafajtában.
3. A különböző talaj-előkészítési körülményekből adódó nehezített körülmények és szárazság hatásának nyomon követése folyamán a 'Jubilant' árpában számos, a külső körülmények hatására megváltozott expressziót mutató karbamid oldódó fehérjét azonosítottam. A kísérletben bizonyítottam, hogy az adott termesztési körülmény megváltoztathatja egyes fehérjék expresszióját.
4. Azonosítottam a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázzal homológ fehérjéket a nehezített körülmények hatására megváltozott pozícióban expresszálódó fehérjék között. Ez a megfigyelés utalhat: az izoformok eltérő szerepére, a különböző szemtermésalkotók különböző izoform regulációjára és a nehezített termesztési körülmény hatására bekövetkező poszttranszlációs módosulásra.
5. A különböző talaj-előkészítési körülmények hatásának vizsgálatokor megállapítottam, hogy a nehezített körülmények és a szárazság következtében számos védekezésben részt vevő enzim expressziója növekedett. Így azonosítottam egy 22,0 kDa (IV

osztály) hősokkfehérje prekuzorral, a GroEL hősokkfehérjével és a peroxidáz enzim egyik izoformjával homológ fehérjét.

6. A nehezített és normál kontroll körülmények között termesztett árpa szemtermés karbamid-oldódó proteomjának összehasonlításakor a szerin proteáz inhibitor Z7 intenzitásának csökkenését figyeltem meg a nehezített körülmények hatására. A jelen kísérlettel egy olyan termesztési körülményt azonosítottam, mely kifejezetten negatív hatással van a sör habstabilitásának kialakításában szerepet játszó fehérje mennyiségére, valamint a hordein fehérjék fokozott szintézisét okozza.
7. 200  $\mu\text{M}$  és 1 mM kadmium-klorid kezelések hatásának proteomikai vizsgálatokor megállapítottam, hogy a kontroll mintához képest a RuBisCO nagy alegységének mennyisége csökkent, melyet a kadmium hatására bekövetkező nagyfokú fehérje degradáció okozott. Ezen kívül a kezelések hatásaként az oxigénfelszabadítást fokozó fehérje (OEE2) expressziójának csökkenését is detektáltam. Eredményeimmel ezen fehérjék kadmium által kiváltott expressziós változását az elsők között igazoltam proteomikai módszerekkel az árpában.

## 5. PUBLIKÁCIÓK

### Folyóiratcikkek:

#### **IF-es folyóiratcikkek:**

V. Gergely, E. Kápolna, A. Süle, Gy. Hajós, D. Mihály, P. Fodor, Preparative liquid isoelectric focusing (Rotofor IEF) based Se-speciation of Se-enriched *Agaricus bisporus*. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. 19, p. 1485 - 1488.

A. Süle, F. Vanrobaeys, Gy. Hajós, J. Van Beeumen, B. Devreese, 2004. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry.* 65, p. 1853-1863.

#### **Nem IF-es folyóiratcikk, magyarul**

L. Tanács, J. Matuz, P. Ács, A. Süle, 1999. Növényvédőszerrel készített cipók paramétereinek alakulása. *Sütőipar XLVI. Évfolyam*, 3, p. 36-38.

### Konferencia kiadványok:

#### **Magyar nyelvű, teljes**

A. Süle, Gy. Hajós, Á. Hoschke, 2002. A nemesítés és a termesztési/klimatikus körülmények hatása sörárpák fehérjéinek összetételére és biológiai aktivitására. *MÉTE Tudományos Diákköri Konferencia Előadásainak Magyar Nyelvű Összefoglalója*, Szeged, p. 34-37.

A. Süle, 1998. Fusárium toxinok gabonafélékben való előfordulása és kimutatási módszerei. *XII. MÉTE OTDK Előadásainak Összefoglalói*. KÉE, Élelmiszeripari Kar, Budapest, p. 145-149.

L. Tanács, A. Süle, Sz. Szabó, Cs. Balogh 1999. Peszticidok állománykezelések hatása a búzafajták szemtermésének sikértartalmára, sikerterülésére és esésszámára. SZFSZ, JATE, SZÉF, Tudományos Közlemények, 20. szám p. 11-23.

### **Magyar nyelvű összefoglaló**

A. Süle, 2003. Gabona stresszfehérjék az élelmiszerbiztonság tükrében. Tudományos Kollokvium előadásainak rövid kivonata, Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Budapest, 285, p. 5.

A. Süle, Á. Hoschke, Gy. Hajós, 2003. Abiotikus stressz hatása az árpa fehérjéire. Összefoglalók. Lippay-Ormos-Vas Tudományos Ülésszak, Budapest, p. 160-161.

A. Süle, Gy. Hajós, 2001. Gabonafehérjék szerkezetének és biológiai aktivitásának vizsgálata.- XXV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Agrártudományi Szekció Előadásainak Magyar és Angol Nyelvű Összefoglalói. Nyugat- Magyarországi Egyetem, Sopron, p. 118.

A. Süle, Cs. Balogh, 1999. Peszticidkezelések hatása őszi búzák sütőipari tulajdonságaira és Fusarium toxintartalmára. XXIV. Országos tudományos Diákköri Konferencia Agrártudományi Szekció Előadásainak Magyar- Angol Nyelvű Kivonata, Gyöngyös, p. 256-257.

### **Nemzetközi konferencia, Procceeding**

A. Süle, Gy. Hajós, A. Tomcsányi, F. Vanrobaeys, 2004. Effect of different growing conditions on proteins of barley seeds. 6th International Conference on Food Science. Proceedings. University of Szeged, College Faculty of Food Engineering. SZTE-SZÉF (CD-ROM: ISBN 963 482 677 6)

### **Nemzetközi konferencia összefoglaló**

A. Hegedűs, A. Süle, É. Sárdi, Gy. Hajós, É. Stefanovits-Bányai (2006): Effect of titanium ascorbate on the photosynthesis related parameters of wheat seedlings.

XV. Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, FESP. 2006. 17-21. July. Lyon, France. *Book of Abstracts, RAS03-025*, p. 187.

A. Süle, A. Tomcsányi, Gy. Hajós, 2004. Environmental effects on the barley seed proteins. 2nd Central European Meeting, 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Croatia, Opatija, p. 171.

A. Süle, Gy. Hajós, A. Tomcsányi, F. Vanrobaeys, 2004. Effect of different growing conditions on proteins of barley seeds. Abstract Book of the VI. International Conference of Food, Szeged, p. 193-194.

A. Süle, F. Vanrobaeys, Gy. Hajós, J. Van Beeumen, B. Devreese, 2004. Effect of heat shock on the proteome of barley shoots. Abstract Book of the 2<sup>nd</sup> European Congress on Food, Budapest, p. 233.

A. Süle, Gy. Hajós, A. Hegedűs, É. B. Stefanovits, 2004. Response to cadmium exposure in the proteins of barley shoots. Abstract Book of the 2<sup>nd</sup> European Congress on Food, Budapest, p. 234.

