

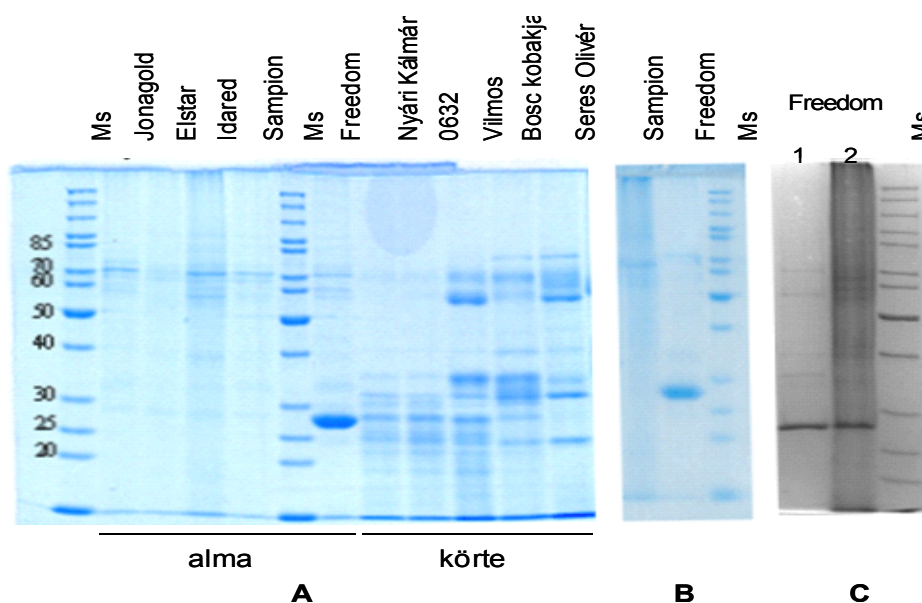
Zárójelentés 82100

Nektárfehérjék szerepe az almafélék tűzelhalás elleni endogén védekezésben

2010-02-01 - 2014-01-31

Dr. Dallmann Géza

A kutatásunk az almafélék tűzelhalásos megbetegedés elleni természetes védekezési mechanizmus biológiai alapjainak felderítését célozza, döntően a nektárban található fehérjékre koncentrálna. Feltételezésünk az, hogy az *Erwinia amylovora* fertőzésre érzékeny fajok/fajták esetében ez a mechanizmus, legalább időlegesen, nem, vagy nem kellő hatékonysággal működik. A fertőzés folyamatának növényi oldalát tekintve feltételezzük, hogy ez a kevésbé hatékony működés a nektárfehérjéket kódoló gének expressziós tulajdonságaival, azok nektárban mérhető koncentrációjával, enzimológiai paramétereikkel, a nektár mennyiségével és a folyékony nektár jelenlétének időtartamával hozható összefüggésbe.



1. ábra Nektárfehérjék összehasonlítása három egymást követő évben.

Az elmúlt évek során megállapítottuk, hogy minden vizsgált nektárban detektálható néhány eltérő molekulatömegű fehérje. Megállapítható továbbá, hogy a fehérjemintázatok – a mennyiségi különbségektől eltekintve – fajon belül hasonlóságot mutatnak, míg fajok között jelentős az eltérés. Szembetűnő, hogy a kimutatható fehérjék mennyiségében (azonos térfogatok kerültek analízisre!) lényeges eltérés tapasztalható a vizsgált fajok között, illetve fajon belül a fajták között is.

A legmarkánsabb eltérést a 27-30kDa-os molekulatömegű fehérje esetében találjuk, ez a Freedom - egy tűzelhalásra toleráns almafajta - nektárjában domináns, míg a többi vizsgált almafajta esetében a kimutathatóság határán mozog, a körtefajtáknál pedig jól detektálható, de a Freedomhoz viszonyítva lényegesen kisebb mennyiségben van jelen. Ennek a 30kDa-os fehérjének a vizsgálatát, molekuláris analízisét tűztük ki feladatul, valamint lehetséges szerepének elemzését az *Erwinia amylovora* fertőzés elleni tolerancia biztosításában. A tömegspektrometriás analízishez a Freedom almafajta nektárjában abundánsan megjelenő protein csíkot PAGE után a gélből izoláltuk, majd alkilálás és redukálás után gélen belül tripszinnel emésztettük. Az egyértelműen azonosítható peptid szekvenciák (2.ábra) alapján ez a vizsgált fehérje homológiát mutat a Q00MX4 UniProt azonosítójú alma fehérjével. A parciális szekvencia alapján degenerált oligonukleotidok tervezésével illetve inverz PCR alkalmazásával izoláltuk a kérdéses gént. A karakterisztikus közbeeső peptid szekvenciák folyamatos ellenőrzése lehetővé tette, hogy a kiindulási szekvenciánál maradjunk.

```

1  XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX 50
51 XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXPAS GTCTGLSADI RXXXXXXXXL 100
101 LLSIGGASGS YSLTSADDAR QVADYIWNNE LGGQSASRPL GDAVLGDVDF 150
151 DIEAGGAQFY DXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX 200
201 XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXPAAPEAA 250
251 PSXXXXXXXX XKSQVLPTIK NSPKYGGVML WNRFYDNGYS ASIKDSI 297

```

2. ábra A tömegspektrometriával azonosítható aminosav szekvenciák.

Elvégeztük a Freedom toleráns almafajtából a kérdéses gén teljes kódoló szekvenciájának izolálását a klasszikus génazonosítási módszereket alkalmazva. A teljes szekvencia ismeretében most már határozottan kijelenthetjük, hogy a toleráns Freedom almafajták nektárjában megtalálható, abundánsan expresszálódó gén egy PR8 /patogén related 8/ típusú fehérjét kódol, a gén az un. III típusú savas kitinázok csoportjába tartozik. Az irodalmi adatok alapján azt találtuk, hogy néhány fehérje a savas kitinázok csoportjából kettős funkcióval rendelkezik, vagyis a kitináz funkcion túl lyozim aktivitása is van. Ilyen típusu fehérje pl. a kaucsukfa hevamin fehérjéje. Az alábbi 3. ábra az általunk izolált protein szekvenciáját, és annak hasonlóságát mutatja az ismert Malus PR8 proteinhez viszonyítva. A két protein 297 ill. 299 aminosav hosszú, a homológia 93%.

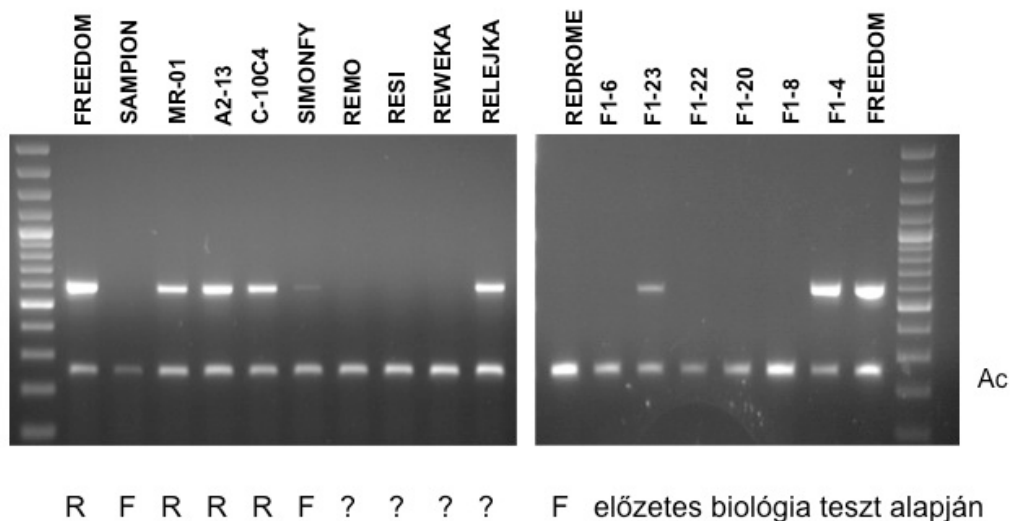
[illegible]

3. ábra Az alma PR8 és Freedom nektárban expresszáldó fehérje összehasonlítása.

Az izolált gén és termékének ismeretében a legfontosabb alapvető kérdés, hogy valóban ez a – Freedom toleráns almafajta nektárjában konstitutív expressziót mutató – gén jellemző-e egyéb toleráns almafajtákra is. Vagyis a kérdést megfogalmazhatjuk úgy is, hogy valóban izoláltunk-e egy olyan gént, amelynek expressziója kizárólagosan jellemző a toleráns almafajtákra, vagy azok egy csoportjára. Ezen túlmenően nemcsak jellemző, hanem a gén expressziójának következménye a megemelkedett szintű *Erwinia amylovora* elleni védekező képesség.

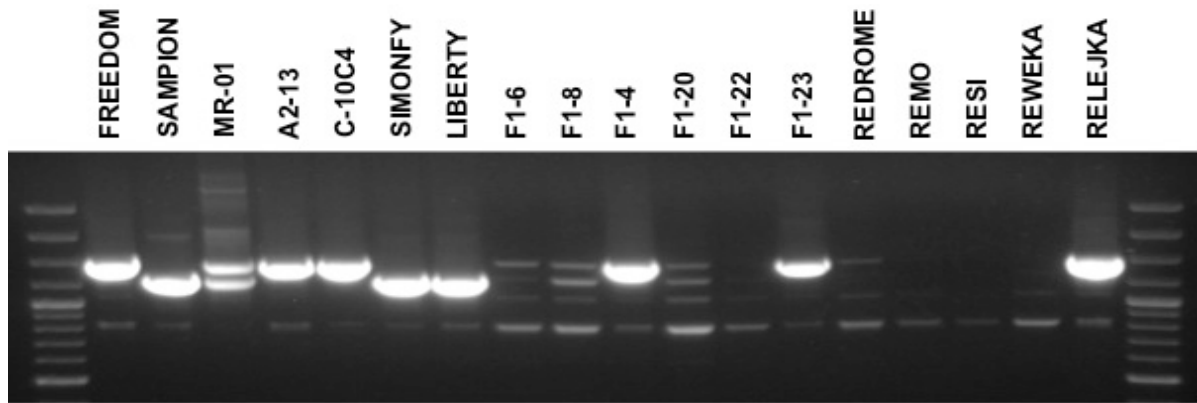
A fenti állítás bebizonyításához számos, az irodalmi adatok és korábbi kísérletes vizsgálatok alapján jól meghatározott, tűzelhalással szemben toleráns és fogékony almafajtákból mintákat gyűjtöttünk. A begyűjtött virágminták hypanthiumából, ahol a nektárszövet található, RNS-t tisztítottunk és ezekkel szemikvantitatív ill. kvantitatív RT-PCR –t végeztünk. A felhasznált oligonukleotid primerer alkalmasak az általunk izolált gén specifikus kimutatására.

Az alábbi képen látható **toleráns** fajták: Freedom, A2-13, MR-01 C-104, Relejka. A fogékony fajták: Sampion, Redrome. A “?” minták jól szerepelnek gombaelleni fogékonysági tesztekben, tűzelhalással szembeni reakciónk kérdéses, nem a legjobbak. Az F1 jelű minták a Freedom x Redrome keresztezés F1 utódai, mint látható a molekuláris marker ezekben szegregál.



4. ábra Fogékony és toleráns almafajták mRNS alapú azonosítása. Ac:actin kontrol.

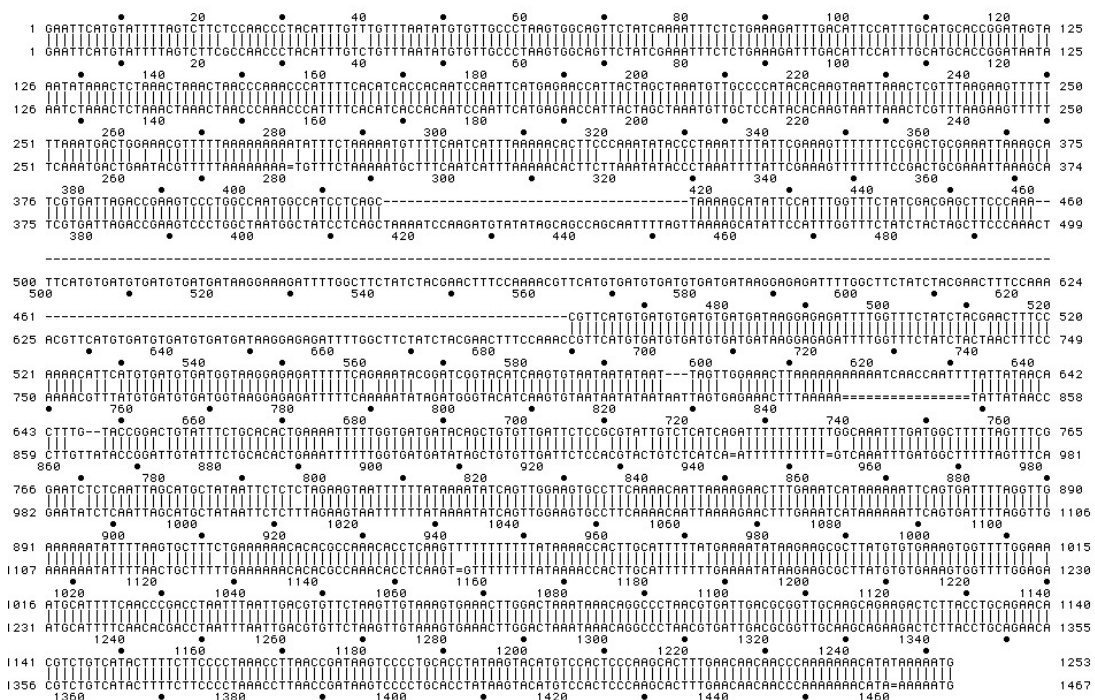
Amint az a fenti mintákon világosan látható a molekuláris marker /600bp/ jelenléte következetes az előzetesen toleránsnak tartott almafajtákban. Ezzel szemben nem figyelhető meg a marker a tűzelhalással szemben fogékony fajtákban ill. az F1 növények egy részében. Az F1 növények azért szegregálódnak, mert az egyik szülő Freedom, nem homozigóta a kérdéses génre, molekuláris markerre. A mRNS alapú azonosítás a PAGE alapú azonosítással megegyező eredményt szolgáltat. Nyilvánvaló, hogy a protein jelenléte alapján történő azonosítás, valamint az mRNS alapú azonosítás időben behatárolt. A mintavétel lehetősége a virágzás idejére, szinte csak egy hétre korlátozódik mindkét esetben. Kerestük olyan molekuláris markerek létrehozásának lehetőségét, amelyekkel szinte egész évben el lehet végezni a fogékony és toleráns fajták azonosítását. Erre a lehetőséget a DNS alapú markerek teremtik meg. A DNS alapú molekuláris markerek létrehozásának alapját a kérdéses gén promóterének izolálása és megszekvenálása szolgáltatta. A toleráns Freedom és a fogékony Sampion fajtákban a szóbanforgó lysozim aktivitással rendelkező gén kódoló szekvenciája azonos, de a gén expressziója eltérő, amint ez a 3. ábra alapján is is határozottan kitűnik. Az eltérő génexpresszió okát az eltérő promóter struktúrában kell szükségszerűen keresnünk. Egyúttal az eltérő promóter szerkezet lehetőséget biztosított DNS alapú markerek létrehozására.



5. ábra Toleráns és fogékony fajták azonosítása DNS alapú molekuláris markerekkel.

A fenti képen látszik, hogy az almafajták három csoportba sorolhatóak a DNS alapú marker segítségével: a toleráns fajták mindig hordozzák a magasabb molekulatömegű DNS markert. A fogékony fajtákban kisebb molekulatömegű DNS fragment található ill. az adott fogékony fajtából nem amplifikál fel a marker karakterisztikus fragmentet. A toleráns és fogékony fajták azonosítása mind a három szinten - fehérje, RNS és DNS – azonos eredményt ad, ebből következik, hogy a nemesítés során a legegyszerűbb DNS alapú azonosítás tetszőlegesen alkalmazható.

A promóterek szekvenciájának elemzése rávilágított egy olyan érdekes eltérésre is, amely magyarázatot adhat az eltérő promóter erősségre is.



6. ábra Freedom és Sampion fajták promótereinek összehasonlítása

A 6. ábrán látható, hogy a Sampion fogékony fajtából származó promóter 214bp-al rövidebb, az összehasonlítás a PCR felamplifikált szekvenciák alapján történt, az egyik végpont a kitináz gén ATG start kodonja. A szekvencia analízis rávilágított arra, hogy az átlagos homológia magas. A lényeges eltérés a két promóter között egy kb 200bp hosszúságú szakaszon figyelhető meg.

Consensus	TTTGGCTTCTATCTACGAACTTCCAAAACGTTTCATGTGATGTGATGTGATGATAAGGAGAGAT
Freedom 470	TTTGGTTTCTATCTACTAGC--TCCAAAACCTTCATGTGATGTGATGTGATGATAAGGAAAGAT
533	TTTGGCTTCTATCTACGAACTTCCAAAACGTTTCATGTGATGTGATGTGATGATAAGGAGAGAT
597	TTTGGCTTCTATCTACGAACTTCCAAAACGTTTCATGTGATGTGATGTGATGATAAGGAGAGAT
661	TTTGGCTTCTATCTACGAACTTCCAAAACGTTTCATGTGATGTGATGTGATGATAAGGAGAGAT
725	TTTGGTTTCTATCTACTAATTTCCAAAACGTTTATGTGATGTGA--TG-G-TAAGGAGAGAT
Sampion 433	TTTGGTTTCTATCGACGAGCTTCCAAA-CGTTTCATGTAATGTGATGTGATGATAAGGAGAGAT
496	TTTGGTTTCTATCTACGAACTTCCAAAACATTCATGTGATGTGA--TG--G-TAAGGAGAGAT

7.ábra Freedom és Sampion fajták promótereiben előforduló repeat elemek.

A Freedom promóter szekvenciában 5db 63bp hosszúságú tandem repeat követi egymást, ezzel szemben a Sampion promóterben a repeat elemek száma csak kettő. Mivel a két promóter között ez a legnagyobb lényeges eltérés, ezért jelenleg úgy véljük, hogy az eltérő mértékű génexpresszió oka is ez az eltérő szekvencia lehet.

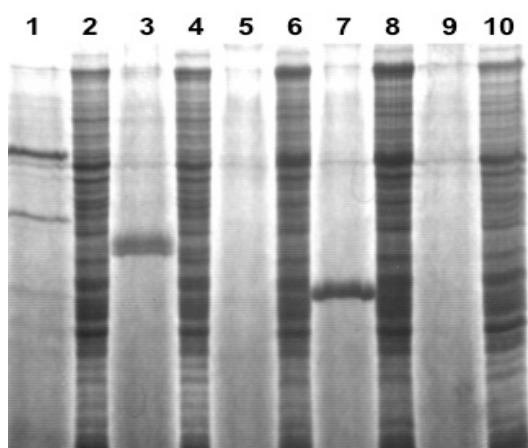
Felmerült annak a lehetősége, hogy a toleráns almafajtából izolált gén lyozim aktivitása felhasználható lehet a tűzelhalás elleni védekezésben. Kézenfekvőnek tűnik, hogy az a gén ill. terméke, amely a nektárszövetekben termelődik és a folyékony nektárba jutva a kitináz és lyozim aktivitásának köszönhetően védelmet biztosít az *Erwinia* fertőzéssel szemben, valamilyen biotechnológiai úton alkalmazható a tűzelhalás ellen.

Az toleráns almafajtából izolált gént bakteriális expressziós vektorba klónozva megteremtettük a kérdéses protein nagy mennyiségű előállításának lehetőségét. A túltermeltetett fehérjével igazoltuk, hogy valóban rendelkezik ez a fehérje lyozim aktivitással. Azonban a bakteriális expresszálatásból adódó nehézséget, nagyon gyakori a túltermeltetett fehérje „inclusion body”-ba záródása, a következőkben élesztő rendszerben való fehérje túltermeltetéssel próbáltuk kiváltani. Fehérje expresszálatás *Pichia pastoris* élesztő törzsben:

A fehérje túltermeltetést a pPICZ A plazmidban létrehozott konstrukciókkal végeztük. A pPICZ A plazmid egyaránt alkalmas extracelluláris és intracelluláris túltermeltetésre.

Amennyiben a termelendő fehérje natív szignálszekvenciája megfelelően működik élesztőrendszerben a fehérje szekretálódik a táptalajba, ahonnan kinyerhető. Szekréciós szignál hiányában, vagy nem megfelelő működés esetén a termeltetett fehérje az élesztőben intracellulárisan termelődik. Négy konstrukciót készítettünk, ezeket élesztőbe transzformálva vizsgáltuk a fehérje termelést. A konstrukciók a következők:

- A, Natív szignálszekvencia - gén - Myc, His Tag
- B, Szignálszekvencia deletálva - gén - Myc, HisTag
- C, Natív szignálszekvencia - gén - Stop, Tag nincs
- D, Szignálszekvencia deletálva - gén – Stop, Tag nincs



7. napos minták

- 1: pPicZA, felülúszó
- 2: pPicZA, feltárt élesztősejt
- 3: ATG-noSTOP klón felülúszó
- 4: ATG-noSTOP klón feltárt é.sejt
- 5: Δ 26-noSTOP klón felülúszó
- 6: Δ 26-noSTOP klón feltárt é.sejt
- 7: ATG-STOP klón felülúszó
- 8: ATG-STOP klón feltárt é.sejt
- 9: Δ 26-STOP klón felülúszó
- 10: Δ 26-STOP klón feltárt é.sejt

8. ábra A savas kitináz túltermeltetése Pichia élesztőrendszerben.

Az expressziós vizsgálatok élesztőrendszerben sikeresek voltak, a gén saját szignálszekvenciája megfelelő arra, hogy az extracelluláris térbe jusson a túltermeltetett fehérje / 3. 7./ A két minta között csak a C-terminális Tag megléte illetve hiánya a különbség. A sikeres túltermeltetés lehetőséget teremthet arra, hogy a fehérjét a tűzelhalás elleni közvetlen védekezésben is felhasználhassuk.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy izoláltunk egy olyan gént, amely a specifikusan a nektárszövetben expresszálódik. Kitináz és lyozim funkciójából következően a termelődő fehérje védő szerepet láthat el a virágon keresztül fertőző Erwinia amylovora ellen. Ez a védekező funkció kihasználható, vagyis egy általános tűzelhalás elleni toleranciával rendelkező fajta rezisztenciája tovább fokozható. Az

általunk azonosított gén hagyományos nemesítéssel, vagy molekuláris biológiai eszközökkel az általános toleranciájú fajtába juttatható. A kifejlesztett molekuláris markerek segítségével a nemesítés során a nektárspecifikus gén jelenléte gyorsan azonosítható.