SZENT ISTVÁN EGYETEM

Az SNF1 kináz komplex alegységeinek izolálása és jellemzése *Solanum tuberosum*-ból

Doktori értekezés

Lakatos Lóránt

Gödöllő
2002

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi doktori iskola

tudományága: Növénytermesztési- és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Virányi Ferenc
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar
Növényvédelemtani Tanszék

Témavezető: Dr. Burgyán József
tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

A burgonya (*Solanum tuberosum*) élelmezési szempontból az egyik legfontosabb növény világszerte. Gazdasági jelentőségét elsősorban sokoldalú felhasználhatóságának köszönheti. A burgonya gumója emberi táplálkozásra, állatok takarmányozására egyaránt alkalmas, ugyanakkor az élelmiszeripar, a keményítő- és szeszgyártás, valamint a gyógyszeripar részére is fontos nyersanyag.

A gumó megvastagodott földalatti szárrész (tartalék tápanyag-raktározó szerv), mellyel a burgonya vegetatív úton tovább szaporítható. A gumók keményítőtartalma a fajtáktól függően 12-24%, a fehérjetartalom pedig 0,7-4,6% között változik.

A levegő CO_2-ja a Calvin ciklusban 6 szénatomos szénhidrátokká alakul át, majd keményítő formájában raktározódik a kloroplasztiszban. A keményítő a levél mezofil sejtjeiben több köztes terméken keresztül szacharózzá alakul, majd floemtranszport útján jut a felhasználás, és a raktározás helyére, ahol a szacharózból ismét keményítő szintetizálódik. A gumó kialakulásához szükséges környezeti tényezők közül kiemelkedő szerepet játszik a nitrogén szint, a nappalok hossza és a fényintenzitás. *In vitro* 8% szacharóz és citokinin hatására a *S. tuberosum* szárszegmentek hónaljrügyeiből gumó fejlődik. Nagy valószínűséggel a gumófejlődés szignálja a magas koncentrációjú (8%) szacharóz, ugyanis a 2% szacharóz és a citokinin hatására a hónaljrügyekből gumó helyett sztóló fejlődik. A gumófejlődés molekuláris eseményeiről korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. Az *in vitro* gumóindukciós rendszer molekuláris vizsgálata során izoláltak néhány gént, amelyeknek nagymértékben megnövekszik a transzkripciós aktivitása a gumófejlődés során. Ezek a gének két csoportra oszthatók: 1. a keményítő bioszintézisben résztvevő gének; 2. tartalékfehérje gének. Ezeknek a géneknek az expresszióját egy gén kivételével a burgonya levelében is lehet indukálni, ami azt mutatja, hogy a burgonya föld feletti részében is megvan a magas szacharóz-koncentráció hatására bekapcsoló jelátviteli útvonal. A patatin

promóterének működését megvizsgálták heterológ rendszerben is, és megállapították, hogy a promóter aktivitása a dohány levelében valamint az Arabidopsis levelében és gyökerében magas szacharóz koncentráció hatására jelentősen megnövekszik. Ez azt mutatja, hogy a magas szacharóz-koncentráció hatására bekapcsoló jelátviteli útvonal konzerváldott a növényekben.

A gumófejlődés indukciójának szignálját és a szignáltranszdukciós útvonal végén lévő szabályozott géneket már ismerjük, azonban a jelátviteli út elemeiről semmilyen információ nem áll rendelkezésünkre. Ezért az érdeklődésünk a gumófejlődés és a tartalékkeményítő-képzés jelátviteli útvonalának megismerése felé irányult.

Az élesztő SNF1 (sucrose non-fermenting) kináz az egyik legjobban jellemzett eukarióta protein kináz. Az SNF1 fehérje részt vesz a katabolit represszió kialakításában, a glikogén felhalmozódás szabályozásában, valamint foszforiláció által módosítja a metabolikus enzimek aktivitását, mintegy központi regulátorként a sejt metabolikus folyamatait irányítja a rendelkezésre álló szénforrás függvényében.

A burgonyagumó, mint raktározásra módosult szerv, fejlődésének legjellegzetesebb eleme a nagymennyiségű szénhidrát felhalmozása. Mivel élesztőben a szénhidrát anyagcsere szabályozásának kulcsenzime az SNF1 kináz, feltételeztük, hogy a gumófejlődés során megfigyelhető keményítő akkumuláció szabályozásában az SNF1 kináz fehérjék fontos szerepet játszhatnak. Ezért célul tűztük ki a burgonya SNF1 kináz és a vele együttműködő fehérjék izolálását és jellemzését.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. Az SNF1 protein kináz család

Az eukarióta sejtek a megváltozott környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodás során rendkívül gyorsan válaszolnak az őket érő külső környezeti ingerekre. A sejtek felszínén lévő receptorok a külső környezeti ingerek (hormonok, növekedési faktorok, különböző metabolitok mennyisége, környezeti stresszek) hatására egy jelátviteli útvonalat indítanak el, ami a sejtben génexpressziós és/vagy enzimaktivitásbeli változás bekövetkezéséhez vezet. A jelátviteli útvonalak működése a fehérjék protein kinázok általi reverzibilis foszforilációján alapul.

Az SNF1 (sucrose non-fermenting) protein kináz család tagjai fontos szerepet játszanak egy nagyon konzervált, feltehetően minden eukarióta sejtben megőrződött, ősi protein kináz szabályozási útvonal kialakításában. Bár az SNF1 protein kináz család tagjainak célfehérjéi (részben) eltérhetnek egymástól, az aktív komplexek szerkezete, működése és szabályozása nagyon hasonló. Az SNF1 kináz család tagjai közé tartoznak a *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 kináz és az emlős AMP-aktivált protein kináz (AMPK) mellett a magasabbrendű növények SNF1 protein kinázai is.

2. 2. Az élesztő SNF1 kináz biológiai szerepe

A mikroorganizmusok, így az élesztő lebontófolyamataiban szerepet játszó számos enzim alá van rendelve a katabolit represszionak nevezett szabályozási folyamatnak. Ha a sejtet gyorsan metabolizálható energiaforrással, például glükózzal látjuk el, úgy megszűnik azoknak az enzimeknek a szintézise, amelyek az alternatív energiaforrások lebontásában vesznek részt. Glükóz jelenlétében az élesztőben gátolt állapotban vannak az alternatív szénforrások (galaktóz, maltóz, szacharóz, etanol, glicerin) hasznosításáért felelős gének mellett a glükoneogenezisben

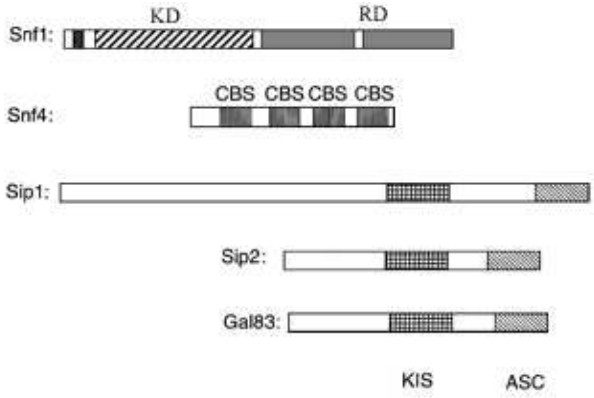
és az oxidatív foszforiláció folyamatában résztvevő enzimek génjei is. A szabályozás kevés kivételtől eltekintve a transzkripció szintjén történik.

Az SNF1 gén alapvető szerepet játszik az összes glükóz-represszálható gén de-represszálásában. Az *snf1* mutációt eredetileg egy olyan mutáns keresési program során azonosították, amely szacharóz hasznosításban sérült élesztőtörzsek izolálására irányult. Az *snf1* mutáció pleiotróp hatásúnak bizonyult, az *snf1* mutáns a szacharózon kívül a galaktózt, a maltózt, a glicerint és az etanolt sem volt képes szénforrásként hasznosítani. (Carlson és mtsai., 1981). Az *snf1* mutációt komplementáló SNF1 gén egy protein kináz domént tartalmazó fehérjét kódol (Celenza és Carlson, 1986). Az SNF1 komplex biológiai szerepére utal, hogy az *snf1* mutáns érzékenyebb a hő- és sóstreszzel szemben, mint a vad típusú élesztő. Az ENA1 stresszgén (plazmamembrán ATP-áz) ozmotikus stressz hatására aktiválódik. Alepuz és munkatársai (1997) azt találták, hogy az ENA1 gén az ozmotikus stressz mellett glükózmegvonásra is indukálódik, mégpedig az SNF1 kaszkádon keresztül. A metallotionein gén hő- és oxidatív stresszre az általános stressz szignáltranszdukciós úton, glükózmegvonásra az ENA1-hez hasonlóan az SNF1 úton keresztül indukálódik (Tamai és mtsai, 1994). Feltételezhető, hogy az élesztő a glükózmegvonást is stresszként érzékeli, ezért a megváltozott körülményekhez az alternatív szénforrások hasznosításáért felelős gének de–represszálása mellett az általános stresszgének bekapcsolásával válaszol. Az SNF1 gén számos egyéb alapvető biológiai folyamat szabályozásában is szerepet játszik, így részt vesz a sporuláció (Hubbard és mtsai, 1992), a glikogén felhalmozás (Hardy és mtsai, 1994), valamint a peroxiszóma biogenezis (Simon és mtsai, 1992) regulációjában is.

2. 2. 1. Az SNF1 kináz komplex felépítése

Az élesztő SNF1 kináz komplexet három fehérje alkotja: (1) katalitikus alegység; (2) aktivátor alegység; (3) az összekötő (adaptor) alegység. Az SNF1 gén egy 72 kD-os protein kinázt kódol, amelynek N-terminálisán a katalitikus domén (KD), C-terminálisán a reguláló

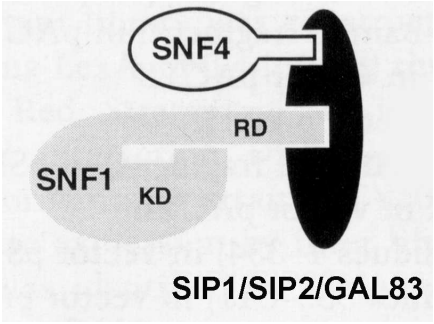
domén (RD) található (Celenza és Carlson, 1986). Az *snf1* mutáns fenotipusát lásd 2. 2. pont. Az SNF4 gén egy 36 kD-os fehérjét kódol, amiben négy, először a cisztation–β–szintáz (CBS) fehérjében azonosított domén található. Az *snf4* nullmutáns élesztőnek hasonló fenotípusa van, mint az *snf1* mutánsnak, azzal a különbséggel, hogy az *snf4* fenotípus gyengül, ha a mutáns törzset 23 ^{o}C alatt tenyésztik. Ezért azt feltételezték, hogy az SNF4 protein az SNF1 kináz aktivátora (stabilizátora). Az SNF4 fehérje az SNF1 proteinnel élesztő fehérjekivonatból immunoprecipitációval együtt izolálható, ami a köztük lévő *in vivo* fizikai kapcsolatot bizonyítja (Celenza és mtsai, 1989). Az SNF1 kináz az élesztősejtben az SNF4 fehérje mellett különböző adaptor alegységekkel (SIP1/SIP2/GAL83) működhet együtt. Az SNF1 protein kinázzal együttműködő SIP1 és SIP2 fehérjéket két-hibrid szűrés módszerével izolálták (Jiang és mtsai, 1992). A GAL83 megállapították, hogy fontos szerepet játszik a GAL1 (galaktokináz) gén szabályozásában (Flick és mtsai, 1990) (2. 1. ábra).



2. 1. ábra. Az SNF1 komplexet alkotó fehérjék domén szerkezete.

Az élesztő SNF1 fehérje az N-terminálison levő katalitikus doménből (KD) és a fehérje C-terminálisán levő regulátor doménből (RD) áll. Az SNF4 fehérjében négy cisztation–β–szintáz (CBS) domén található. A SIP1/SIP2/GAL83 fehérjék C-terminálisán található az SNF1 kötésért felelős KIS domén és az SNF4-gyel kapcsolatot kialakító ASC domén

A katalitikus, az aktivátor és az összekötő alegységek kapcsolatait, illetve az egyes domének szerepét a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában két-hibrid rendszerrel vizsgálták. A SIP1, SIP2 és a GAL83 fehérjék ugyan eltérő hosszúságúak de két jól elkülöníthető szakaszon jelentős mértékű homológiát mutatnak egymáshoz: (1) a belső ún. KIS (Kinase Interacting Sequence) doménnel kapcsolódik az SNF1 kinázhoz; (2) a C-terminálishoz közelebb eső ún. ASC (Association with the SNF1 Complex) domén létesít kötést az SNF4 proteinnel (2. 1 ábra). Mivel a SIP1/SIP2/GAL83 fehérjék N-terminálisai nem mutatnak jelentős hasonlóságot egymáshoz, ezért azt feltételezik, hogy az alternatív módon felépülő SNF1 kináz komplexben az összekötő alegység közvetíti a szubsztrátokat a katalitikus alegység felé (Jiang és Carlson, 1997) (2. 2. ábra).



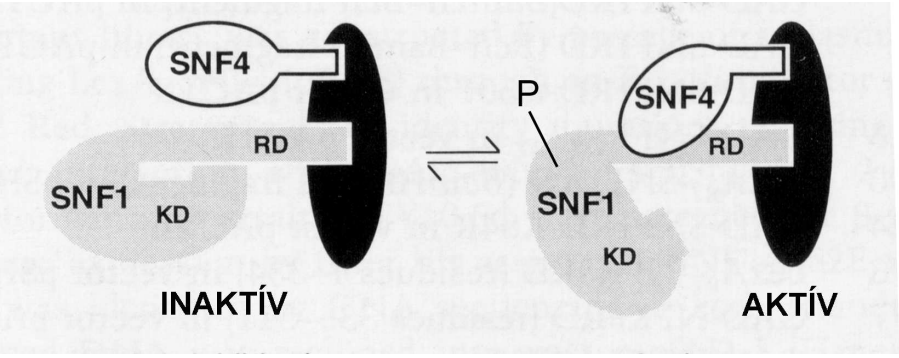
2. 2. ábra. Az SNF1 komplex felépítése.

Az SNF1 kináz komplexben a SIP1/SIP2/GAL83 géncsalád tagjai adaptor funkciót látnak el, megkötik és ezáltal egy térbe hozzák a komplex katalitikus (SNF1) és aktivátor (SNF4) alegységeit.

2. 2. 2. Az SNF1 kináz komplex működése

Az SNF1 komplex működése során bekövetkező protein-protein kölcsönhatások az élesztő két-hibrid módszerrel könnyen nyomon követhetők. Megállapították, hogy magas glükózszint (glükózrepresszált

állapot) esetén az SNF1 fehérje katalitikus és regulátor doménje egymáshoz kapcsolódik, ezért az SNF1 kináz inaktív állapotban van. De-represszáló körülmények között (alacsony glükózszint) az SNF1 fehérjét egy eddig még nem azonosított kináz foszforilálja, ezáltal megszűnik a fehérje katalitikus és regulátor doménje közötti kapcsolat. Így az SNF4 protein az SNF1 kináz regulátor doménjéhez kapcsolódhat, ezért az SNF1 katalitikus domén szabaddá válik, így az SNF1 kináz aktív állapotba kerül. (Jiang és Carlson, 1996) (2. 3. ábra).



2. 3. ábra. Az SNF1 kináz komplex működése

Glükóz-represszáló körülmények között az SNF1 komplex inaktív állapotban van, az SNF1 kináz katalitikus doménje (KD) a regulator doménhez (RD) kapcsolódik. De-represszáló körülmények között a katalitikus (SNF1) alegység foszforilálódik és ennek következtében az SNF4 fehérje a regulátor doménhez kapcsolódik; a katalitikus domén szabaddá válásával SNF1 komplex aktiválódik.

2. 2. 3. Az SNF1 komplex szabályozása

Az SNF1 kináz alacsony glükózszintnél aktív, magas glükózszintnél inaktív állapotban van (2. 3. ábra). Glükózmegvonáskor az AMP/ATP arány kb. a 100-szorosára növekszik, és ez jól összefüggésbe hozható az SNF1 kináz aktivitásnövekedésével (Davies és mtsai, 1989). A tisztított SNF1 protein, szemben az emlős analóg AMPK-val, *in vitro* nem aktiválható hozzáadott AMP-vel. Ezzel szemben a tisztított, aktív állapotban lévő SNF1

protein, hasonlóan az AMPK-hoz inaktiválható emlős protein-foszfatázzal, és újra aktív állapotba hozható AMPKK-val (AMP-aktivált protein kináz kináz) (Wilson és mtsai, 1996). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy annak ellenére, hogy az SNF1 kináz nem aktiválható AMP-vel, mint az AMPK, az SNF1 valószínűleg egy hasonló protein kináz kaszkád tagja, mint az AMPK (lásd 2. 3. pont).

Eddig még nem sikerült azonosítani az SNF1 fehérjét aktiváló (feltehetőleg) protein kináz aktivitással rendelkező fehérjét. Mivel az SNF1 és SNF4 fehérjék csak az aktiválódott kináz komplexben lépnek fizikai kapcsolatba egymással, ezért megvizsgálták az SNF1 és SNF4 proteinek együttműködését a *hxk2 glc7* és a *reg1* mutánsokban (Jiang és Carlson, 1996). A HXK2 gén kódolja a legnagyobb mennyiségben termelődő hexokináz izoformát, ami a glikolízisben a glükóz glükóz-6-foszfáttá alakulását katalizálja. A *hxk2* mutánsban az SNF1-SNF4 protein-protein interakció glükóz jelenlétében is bekövetkezik, tehát az SNF1 komplex aktív állapotban van. Ebből arra következtettek, hogy a hexokináz2 gén terméke az SNF1 komplex (egyik) negatív regulátora, amely meghatározza az SNF1-SNF4 kölcsönhatást magas glükózszintnél. A hexokináz2 enzim egy kettősfunkciójú fehérje, a hexóz foszforilációjáért felelős katalitikus és a glükózrepresszió fenntartásáért felelős reguláló domének pontmutációkkal elkülöníthető (Trumbly, 1992).

A GLC7 gén az élesztőben a protein-foszfatáz I (PPI) fehérjét, a REG1 gén a protein-foszfatáz I reguláló alegységét kódolja. A PPI nullmutációja letális, azonban abban a *glc7* mutánsban, amelyben a fehérje 152. treonin aminosavát lizinre cserélték (glc7T152K), valamint a deléciós *reg1* mutánsban az SNF1-SNF4 protein-protein interakció glükóz jelenlétében is mérhető és a mutánsokban megszűnik a glükózrepresszió. A vad típusú élesztőben a REG1 és GLC7, illetve a REG1 és SNF1 proteinek együttműködését két-hibrid rendszerrel és ko-immunoprecipitációval is bebizonyították. Feltehetőleg a GLC7 a REG1 proteinen keresztül defoszforilálja, ezáltal inaktiválja az SNF1 komplexet (Ludin és mtsai, 1998). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GLC7 és REG1 fehérjék a hexokinázhoz hasonlóan az SNF1 komplex negatív regulátorai.

2. 2. 4. Az élesztő SNF1 kináz által közvetlenül szabályozott fehérjék (szubsztrátok)

Az SNF1 kináz a glükóz-represszált gének transzkripcióját közvetve, szubsztrátjain keresztül szabályozza. Jelenleg három ilyen SNF1 szubsztrát ismert, a MIG1, a SIP3 és a SIP4 fehérjék.

Az élesztőben a glükóz az alternatív szénforrások hasznosításáért felelős gének mellett, a glükoneogenezisben és a légzésben résztvevő enzimek génjeinek transzkripcióját is gátolja. Ezért nem meglepő, hogy ezeknek az eltérő biológia folyamatokban szerepet játszó, de egyaránt glükóz-represszálható géneknek a promótereiben hasonló elemek találhatók, tehát azonos reguláló fehérjék kötődhetnek hozzájuk. Például a MIG1 transzkripciós represszor kötőhelye a legtöbb glükóz által represszálható gén promóterében megtalálható. Glükózt tartalmazó táptalajon tenyésztett élesztőben a szekretált invertázt kódoló gén (SUC2) represszált állapotban van, a represszió a SUC2 promóterhez kapcsolódó MIG1 represszor tartja fent. Glükózmegvonás során az SNF1 kináz aktiválódik, és foszforilálja a MIG1 represszort, ami ezután már nem képes DNS-t kötni, leválik a promóterről, így a SUC2 gén felszabadul a represszió alól. Így a SUC2 gén aktivitását közvetlenül a MIG1 represszor foszforiláltsági foka határozza meg (Trumbly, 1992). Valószínűleg az SNF1 hasonló módon szabályozza más, MIG1 kötőhelyet tartalmazó gének expresszióját is.

A SIP3 gén egy 142 kDa-os, leucin-zippzár motívumot tartalmazó, feltehetően transzkripciós faktorként funkcionáló fehérjét kódol. Azt az elképzelést, hogy a SIP3 fehérje az SNF1 kináznak *in vivo* szubsztrátja, alátámasztja az a tény, hogy az *snf1* mutánsban a SIP3 fehérje túlexpresszáltatása visszaállítja a SUC2 gén vad típushoz hasonló szabályozását (Lesage és mtsai, 1994). Azonban az a megfigyelés, hogy a *sip3* mutánsnak nincs *snf1* fenotípusa jelzi, hogy az SNF1 kináz más szubsztrátokon keresztül is befolyásolhatja egyes gének átírását.

A SIP4 gén egy 96 kDa-os, transzkripciós faktor fehérjét kódol. A SIP4 fehérje a glükoneogenezisben szerepet játszó malát-szintáz és izocitrát-liáz gének transzkripciós aktivátora. A SIP4 fehérje csak

foszforilált formában képes e gének promótereihez kötődni és a transzkripciót iniciálni. A SIP4 transzkripciós faktort glükózéheztetéskor az SNF1 protein kináz foszforilálja.
gal83 mutánsháttérben az SNF1 és SIP4 fehérjék nem működnek együtt, azonban a *sip1*, *sip2* mutánsokban a vad típussal megegyező erősségű SNF1-SIP4 protein-protein interakciót mértek. A jelenség csak úgy magyarázható, hogy a vad típusú élesztőben a GAL83 fehérje létesít kapcsolatot az SNF1 és SIP4 proteinek között (Lesage és mtsai, 1996).

Ezek az adatok alátámasztják azt az elképzelést, hogy az SNF1 kináz komplexben a SIP1/SIP2/GAL83 fehérjék közvetítik a katalitikus alegység felé a szubsztrátokat. Így az alternatív módon felépülő SNF1 komplex aktuális adaptor alegysége határozza meg, hogy a komplex melyik gén, vagy géncsoport szabályozásában vesz részt (Vincent és Carlson, 1999).

Transzkripciós szabályozás mellett az élesztő SNF1 kináz a citoplazmában található metabolikus enzimek poszt-transzlációs szabályozásában is részt vesz. A zsírsav bioszintézis kulcsenzime, az acetil-KoA karboxiláz (ACC-áz) glükóz éheztetéskor foszforiláció által inaktiválódik. Az SNF1 kináz foszforilálja és ezáltal inaktiválja az acetil-KoA karboxilázt *in vitro* (Mithelhill és mtsai, 1994). Az acetil-KoA karboxiláz azonban valószínűleg az SNF1 kináz közvetlen szabályozása alatt áll, ugyanis az *snf1*mutánsban glükóz éheztetéskor az ACC-áz inaktiválódása nem következik be (Woods és mtsai, 1994).

2. 3. Az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) rendszer

Az élesztő SNF1 protein kinázzal homológiát mutató emlős fehérje, az AMPK felfedezéséhez a biokémiai megközelítés vezetett. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A reduktáz (HMG-KoA reduktáz) szabályozását vizsgálva azt találták, hogy az enzim foszforiláció által inaktiválódik és az inaktiválást végző citoplazmatikus faktor maga is foszforiláció de-foszforiláció útján szabályozódik (Beg és mtsai, 1978). Ferrer és mtsai (1985) kimutatták, hogy a HMG-KoA reduktáz kináz ATP jelenlétében

inaktív, de AMP jelenlétében gyorsan aktiválódik. Hardie és mtsai bizonyították, hogy a HMG-KoA reduktáz közvetlen szabályozásáért egy bizonyos protein kináz aktivitással rendelkező faktor a felelős, és a HMG-KoA reduktáz kinázt AMP aktivált kináznak (AMPK) nevezték el (Hardie és mtsai, 1989).

2. 3. 1. Az emlős AMPK komplex felépítése

Az AMPK-t először patkánymájból tisztították. A fehérje preparátum sztöchiometrikus mennyiségben tartalmazott egy 63, egy 38 és egy 35 kDa-os fehérjét (Carling és mtsai, 1989). A három fehérjének megfelelő cDNS-eket cDNS könyvtárból izolálták, meghatározták a cDNS-ek nukleinsav és az ebből származtatott fehérje aminosav sorrendjét. A 63 kDa-os fehérje, a katalitikus (α) alegység aminosavszinten 47%-os homológiát mutatott az élesztő SNF1 protein kinázhoz. Az AMPK N-terminálisán egy jellegzetes szerin/treonin protein kináz domén, a C-terminálisán a regulátor domén található. Az AMPK kináz katalitikus doménje 64%-os, regulátor doménje 32%-os homológiát mutatott az élesztő SNF1 protein kináz megfelelő részeihez. A γ alegységnek elnevezett 38 kDa-os fehérje négy ismétlődő, kb. 30 aminosav hosszúságú, a cisztation–β–szintázban is meglévő domént tartalmaz, és a teljes hosszúságú fehérje 35%-os homológiát mutat az élesztő SNF4 fehérjéhez. A β alegység (35 kD-os fehérje) dedukált aminosav sorrendje alapján az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 géncsalád fehérjéinek feleltethető meg. A SIP1/SIP2/GAL83 fehérjék KIS doménjei átlagosan 30%-os, ASC doménjei átlagosan 40%-os homológiát mutatnak a 35 kDa-os β alegység megfelelő részeihez (Hardie és mtsai, 1998, összefoglaló). Az β és γ alegységek funkciója még pontosan nem ismert, azonban a katalitikus alegység maximális kináz aktivitásának eléréséhez mind a három alegység együttes jelenléte szükséges (Dyck és mtsai, 1996). Az α, β és γ alegységek egymáshoz való kapcsolódását immunprecipitációval vizsgálták. Megállapították, hogy az α és a γ alegység külön-külön, erősen kapcsolódik

a β alegységhez. Azonban az α és γ alegység közvetlen kapcsolódásának mértéke a kimutathatóság alsó határán van (Woods és mtsai, 1996a).

A katalitikus (α) alegység funkcionális vizsgálatát deléciós mutánsok létrehozásával valósították meg. Az 548 aminosav hosszúságú AMPK C-terminálisának utolsó 156 aminosava tartalmazza a β és γ alegységek kötőhelyét, ugyanis az α_{1-392} mutáns maximális katalitikus aktivitásához nem szükséges a β és γ alegységek jelenléte. A teljes hosszúságú AMPK fehérje AMP hatására allosztérikusan aktiválódik. A α_{1-312} mutáns aktiválódása nem igényel AMP-t, ami azt jelenti, hogy az AMP kötőhely a 312. és 392. aminosav közötti részen helyezkedik el. A katalitikus domén 172. treoninját (T172) alaninra, vagy aszparaginsavra cserélve katalitikus aktivitással nem rendelkező fehérjét kaptak mind a teljes hosszúságú, mind a csonka fehérje esetében. Az AMPK fehérjében lévő T172-nek megfelelő aminosav minden szerin/treonin protein kinázban a katalitikus domén aktivációs szegmentjében található, eltávolítása, vagy más aminosavra történő cseréje a katalitikus aktivitás csökkenését, vagy megszűnését okozza (Crute és mtsai, 1998).

Ezek az eredmények alátámasztották, hogy az AMPK komplex felépítése és működése nagyon hasonlít az élesztő SNF1 kináz komplexhez: az α és a γ alegységet a β alegység hidalja át. Az α és a γ alegység közvetlen kapcsolata feltehetőleg csak a katalitikus alegység aktiválódásakor alakul ki (Woods és mtsai, 1996a)

2. 3. 2. Az AMPK komplex regulációja

2. 3. 2. 1. Az AMPK komplex *in vivo* regulációja és élettani szerepe

Az élőlények sejtjeinek legfontosabb energia tároló molekulája az ATP. A lebontó folyamatokból származó energia az ATP-szintázok működése révén ATP-vé alakul:

$$(ADP+Pi \rightarrow ATP)$$

A felépítő folyamatok energiaigényüket az ATP nagyenergiájú foszfodiészter kötésének bontásából fedezik:

$$(ATP \rightarrow ADP+Pi,\ ATP \rightarrow AMP+PPi)$$

Egészséges sejtekben az $ADP \leftrightarrow ATP$ átalakulás az ATP szintézis irányába van eltolódva, ezért az ATP/ADP arány 10:1. Az eukarióta sejtekben az ATP szintézisét az adenilát-kináz is végezheti:

$$2ADP \leftrightarrow ATP+AMP$$

A reakció közel áll az egyensúlyi állapothoz, egyensúlyi állandója megközelítőleg 1. Mivel a reakció egyensúlyi állandója ~1, ezért a sejtekben az AMP/ATP arány megközelítőleg az ADP/ATP arány négyzetével egyenlő. Optimális körülmények között az eukarióta sejtekben az ADP/ ATP arány kb.1:10, ezért az adenilát–kináz az ATP bontását fogja katalizálni:

$$2ADP \leftarrow ATP+AMP$$

Mivel az adenilát-kináz ATP bontó reakciója az AMP koncentrációjának csökkenésével jár, ezért az AMP/ATP koncentrációjának aránya megközelítőleg 1:100 lesz. Így az intenzíven osztódó, optimális körülmények között növekedő sejtekben az AMP aránya alacsony, ezért az AMPK inaktív állapotban van. Ha a sejt éhezik, vagy más környezeti stressz éri, akkor az AMP/ATP arány akár 1:25-re is növekedhet, ami már elég az AMPK aktiválódásához (Hardie és Hawley, 2001). Tehát az AMPK a sejt energia ellátottságának monitora, ha a sejt tartalékai elfogynak, aktiválja a lebontó folyamatokat (pl. zsírsavlebontás), és inaktiválja a nagy energiaigényű felépítő folyamatokat (szterol és izoprén bioszintézis), így védi a sejtet a környezeti stresszek káros hatásaitól (Hardie és Hawley, 2001) (2. 4. ábra).

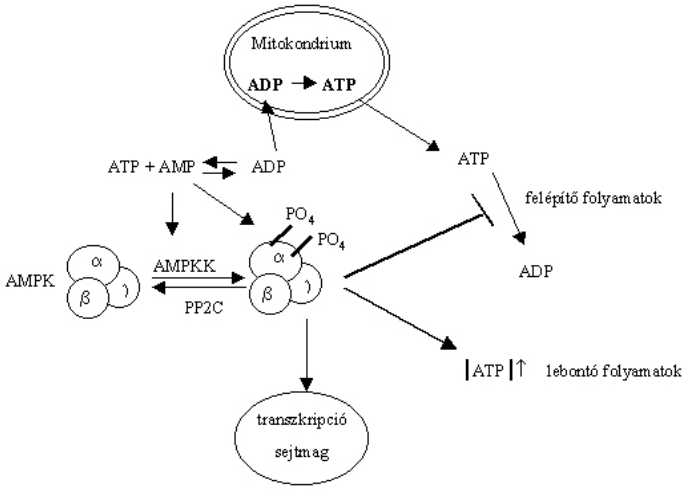
Az AMPK működését az emlősök vázizomzatában ismerik a legjobban. Rövid ideig tartó izomműködés során a glikolízis glükózszükségletét a sejt a glikogénlebontásból fedezi. A glikolízisben keletkezett acetil-KoA nagy része eloxidálódik, az oxidáció során

felszabadult energia ATP szintézisre fordítódik. Az acetil-KoA egy része a citoplazmában az acetil-KoA karboxiláz (ACC-áz) enzim hatására malonil-KoA-vá alakul. A malonil-KoA bizonyos koncentráció felett gátolja a sejtek zsírsav felvételét és a zsírsavak oxidációját (Kudo és mtsai, 1996). Hosszú ideig tartó intenzív izommozgás a máj glikogén tartalékainak kimerüléséhez vezet, az AMP/ATP arány megnövekszik, ami az AMPK aktiválódását eredményezi. Az aktiválódott AMPK foszforilálja, ezáltal inaktiválja az ACC-ázt, ami a malonil-KoA mennyiségének csökkenését vonja maga után. Ha a malonil-KoA koncentrációja elér egy bizonyos alsó határértéket, akkor a zsírsavak sejtbe történő transzportja és oxidációja felszabadul a gátlás alól. Ezután a kimerülő glikogénforrások helyett, a zsírsavakból képződő acetil-KoA szolgál energiaforrásként (Winder és Hardie, 1996; Kudo és mtsai, 1996).

Az AMPK működését emlős sejttenyészetekben is vizsgálták, és megállapították, hogy minden olyan tenyésztési körülmény, ami az AMP/ATP arányt megemeli, az AMPK aktivációját idézi elő. Magas fruktóz koncentráció alkalmazása az ATP szint gyors csökkenésével és az AMP/ATP arány növekedésével jár, ugyanis a sejtekbe bejutó fruktóz nagyobb sebességgel foszforilálódik, mint amekkora sebességgel a glikolízisbe képes belépni. Ezért vezet a magas fruktóz koncentráció alkalmazása az AMPK aktivitásának tranziens megemelkedéséhez (Moore és mtsai, 1991). A sejt energiatermelő folyamatainak gátlása szintén az ATP szint gyors csökkenését okozza. Az arzenit a liponsav kofaktort tartalmazó piruvát-dehidrogenáz és az α–keto-glutarát-dehidrogenáz enzimekhez kapcsolódva gátolja a trikarbonsav ciklus működését. Az oxidatív foszforiláció gátlása -Na-aziddal, antimicin-A-val, dinitro-fenollal- az ATP szint gyors csökkenését, és az AMPK aktiválódását idézi elő emlős sejttenyészetben. A hősokk, hipoxia, és különböző nehézfém-ionok is aktiválják az AMPK-t, az azonban nem ismert még, hogy ezek a stresszek hogyan emelik az AMP/ATP arányt (Hardie és mtsai, 1998).

2. 3. 2. 2. Az AMPK komplex *in vitro* regulációja

Az AMPK komplex közvetlen szabályozását *in vitro* kísérletekkel vizsgálták. A részlegesen tisztított AMPK fehérjét *in vitro* körülmények között az emlős protein-foszfatáz fehérje (PPC2) inaktiválja. Az inaktivált AMPK AMP és Mg^{2+} ionok hozzáadásával újra aktív állapotba hozható. A további vizsgálatok során kiderült, hogy az újraaktiváláshoz az AMP-n és a Mg^{2+}ionon kívül, egy a részlegesen tisztított AMPK frakcióban is megtalálható fehérjére, az AMP-aktivált kináz kinázra (AMPKK) is szükség van (Hawley és mtsai, 1996). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AMPK egy protein kináz kaszkád tagja (2. 4. ábra).



2. 4. ábra Az AMPK a sejtek globális stressz regulátora.

Az AMPK aktiválódik minden olyan körülmény hatására, ami az AMP/ATP arányt megemeli. Az aktív AMPK transzkripciós és poszt-transzlációs szinten gátolja az ATP csökkenéssel járó felépítő folyamatokat és aktiválja az ATP termelő lebontó folyamatokat. PPC2, protein-foszfatáz 2

Az élettani vizsgálatok eredményei alapján, az AMPK aktivitását elsősorban az AMP szint határozza meg. Az *in vitro* vizsgálatokból ismert, hogy az AMP többféleképpen is részt vesz az AMPK szabályozásában. Az

AMP az AMPK-hoz kötődve: (1) allosztérikusan aktiválja az AMPK-t; (2) az AMPK-AMP jobb szubsztrátja az AMPKK-nak, mint AMPK; (3) gátolja az AMPK defoszforilációját és inaktivációját (Hardie és mtsai, 1998).

2. 3. 3. Az AMPK szubsztrátjai

Az AMPK szubsztrátjai elsősorban a metabolikus folyamatokban vesznek részt. Az AMP koncentrációjának csökkenése esetén az AMPK α_2 aktiválódik, és a lebontó folyamatok kulcsenzimeit aktiválja, míg a felépítő folyamatok enzimeit foszforiláció által inaktiválja. A HMG-KoA reduktáz volt az egyik első enzim, amit az AMPK szubsztrátjaként azonosítottak. HMG-KoA reduktáz az izoprén és koleszterol bioszintézis kulcsenzime, katalizálja a β-hidroxi-β-metil-glutaril-KoA → mevalonsav átalakulást. Az AMPK a patkány HMG-KoA reduktáz fehérje 871. szerin aminosavának foszforilálásával inaktiválja az enzimet, így az energiaigényes koleszterol bioszintézist leállítja (Clark és Hardie, 1990) (2. 4. ábra).

Az ACC-áz a zsírsavszintézis kulcsenzime, a sejtekben az ATP szint csökkenése következtében inaktiválódik. Az AMPK α_2 az ACC-áz enzim 79., 1200. és az 1215. pozíciójában levő szerin (S) aminosavakat (S79, S1200, és S1215) képes forszforilálni. Azonban az emlőssejtekben expresszáltatott mutáns ACC-áz, amelyben a 79. pozícióban lévő szerint alaninra cserélték (S79A), nem inaktiválódik, ezért feltehetőleg a S79 az AMPK elsődleges célpontja a fehérjén (Munday és mtsai, 1988 és Davies és mtsai, 1990).

Az AMPK *in vitro* foszforilálja a szénhidrát tartalékképzésben kulcsszerepet játszó glikogén-szintáz enzim 7. pozíciójában (S7) lévő szerin aminosavat. A S7 foszforilációja elősegíti az S10 kazein-kináz-1 általi foszforilációját, ami az enzim aktivitásának nagymértékű csökkenését eredményezi (Zhang és mtsai, 1993) (2. 4. ábra).

Az AMPK a metabolikus enzimek poszt-transzlációs módosítása mellett a génexpresszió szabályozásában is részt vesz.

Az AMPK konstitutívan aktív és domináns negatív változatait fejeztették ki és AICA ribozid (szintetikus 5'-AMP analóg) hatására

bekövetkező génexpressziós változásokat találtak patkány májszövetben. Az AICA ribozid aktiválta az AMPK-t, aminek hatására a zsírsav bioszintézisben résztvevő gének (ACC-áz, zsírsav szintáz) és a glikolízisben résztvevő piruvát kináz transzkripciós szintje jelentős mértékben csökkent (Woods és mtsai, 2000).

2. 4. A növényi SNF1 kinázok

Az első növényi SNF1 kinázt Alderson és mtsai (1991) izolálták rozs endospermium cDNS könyvtárból. Az RKIN1 cDNS átlal kódolt fehérje 48%-os homológiát mutatott az élesztő SNF1-gyel. Az RKIN1-hez aminosav szinten magas homológiát mutató SNF1 kinázokat kódoló cDNS-eseket és genomi klónokat izoláltak *Arabidopsis thaliana*-ból (AKIN10, ATSKIN1), árpából (BKIN1, BKIN12), dohányból (NPK5), cukorrépából (SBKIN154), rizsből, (RSK1, RSK5), és burgonyából (PKIN1) is (Halford és Hardie, 1998). A növényi SNF1 kinázok szerkezete hasonlít az élesztő SNF1 és az emlős AMPK kinázokra, a 11 szubdoménből álló katalitikus domén a fehérje N-terminálisán, a reguláló domén a C-terminálison helyezkedik el. A növényi és az élesztő SNF1 kinázokra a szekvencia homológia mellet funkcionális hasonlóság is jellemző: a rozs RKIN1 és a dohány NPK5 cDNS-ek is komplementálták az *snf1* élesztőmutánst (Alderson és mtsai 1991; Muranaka és mtsai 1994).

2. 4. 1. A növényi SNF1 kinázok szubsztrátjai

A növényi SNF1 kinázok molekuláris biológiai analízisével párhuzamosan végezték az SNF1 proteinek biokémiai jellemzését is. Az emlős AMPK aktivitást mérő ún. SAMS peptid foszforilációs vizsgálatot (Davies és mtsai, 1990) sikeresen használták a növényi SNF1 kinázok aktivitásának mérésére. Az emlős AMPK és a növényi SNF1 kinázok szubsztrátspecifitása nagyon hasonló (Hardie és Carling 1997). Ezért legelőször az emlős rendszerben már jól jellemzett HMG-KoA reduktáz szabályozását vizsgálták meg a növényekben.

Mackintosh és mtsai (1992) vizsgálataik során megállapították, hogy a karfiolból származó HMG-KoA reduktázt egy kb. 58 kDa nagyságú fehérje foszforiláció által inaktiválja. Az AMPK-hoz és az élesztő SNF1 kinázhoz hasonlóan a karfiol HMG-KoA reduktáz kináz is egy protein kináz kaszkád tagja. A végső bizonyítékot, hogy a HMG-KoA reduktáz kináz a növényi SNF1 kinázok családjába tartozik az a kísérlet szolgáltatta, amelyben a HMG-KoA reduktáz kinázt a rozs RKIN1 fehérje elleni ellenanyag felismerte.

Burgonyában az ún. antiszenz technikával gátolták a PKIN1 nevű SNF1 kináz működését és a transzgénikus növények gumójában a szénhidrát lebontásában és a keményítő bioszintézisében résztvevő enzimek aktivitását mérték. A szacharóz indukálható szacharóz-szintáz (SUSY1) aktivitása jelentős mértékben alacsonyabb volt a transzgénikus növényekben, mint a vad típusú burgonyában. A PKIN1, az élesztő SNF1-hez hasonlóan, valószínűleg transzkripciós szinten szabályozza a génexpressziót, hiszen a PKIN1 antiszenz növények gumójában nem tudtak kimutatni SUSY1 transzkriptumot (Purcell és mtsai, 1998).

A növényi SNF1 kinázok az élesztő SNF1 és az emlős AMPK kinázokhoz hasonlóan poszt-transzlációs és transzkripcionális szintű szabályozásában is részt vesznek.

2. 4. 2. A növényi SNF1 kinázok szabályozása

Mivel az élesztő SNF1 kináz fontos szerepet játszik a szénhidrát metabolizmus szabályozásában, ezért hasonló funkciót tulajdonítanak neki a növényekben is. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, hogy *Arabidopsis thalinana*-ból származó PRL1 (Pleiotrop Regulatory Locus) fehérje erősen kötődik az Arabidopsis AKIN10 és az élesztő SNF1 kináz reguláló doménjehez az élesztő két-hibrid rendszerben. Az AKIN10-PRL1 fehérje-fehérje interakció az élesztő két-hibrid rendszerben glükóz de-represszáló körülmények között sokkal erősebb, és a PRL1 fehérje az AKIN10 foszforilálódását (aktiválódását) gátolja *in vitro*, ezért negatív reguláló szerepet tulajdonítanak neki (Bhalerao és mtsai, 1999).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3. 1. Baktérium és élesztő törzsek

- *Escherichia coli* DH5α F′- deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) supE44 l- thi-1 gyrA96 relA1 *ΔLacZYA*-orgF
- *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) Δ(*mcrA*)*183 Δ*(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10* (Tet^r)]
- *Escherichia coli* BL21 (Novagen) B F$^-$ *dcm ompT hsdS(*r_B- m_B-) *gal*
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) B F$^-$ *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal* λ(DE3)
- *Saccharomyces cerevisiae* YRG-2 (Stratagene) Matα *ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538* LYS2::UAS_{GAL1}-$TATA_{GAL1}$-HIS3 URA3::$UAS_{GAL4\ 17mers(x3)}$-$TATA_{CYC1}$-*lacZ*
- *Saccharomyces cerevisiae* Y190 Matα *ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4Δ gal80Δ* LYS2::UAS_{GAL1}-$TATA_{HIS3}$-HIS3 URA3::$UAS_{GAL4\ 17mers(x3)}$-*LacZ*

3. 2. Növényi anyagok

Kísérleteink során *Solanum tuberosum* cv. Keszthelyi 855 vonalat használtuk.

3. 3. Molekuláris biológiai technikák

A molekuláris biológiai módszerek közül a plazmid izolálást, az agaróz gélelektroforézist, a restrikciós endonukleázzal történő emésztést és a molekuláris klónozást Sambrook és mtsai (1989) alapján végeztük. A polimeráz láncreakciót (PCR) 50 µl-es térfogatban, 1×PCR pufferben (50 mM TRIS pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$,), 200-200 µM dATP,

dCTP, dTTP, dGTP és 20–50 pM primer jelenlétében, 2,5 egység *Taq* polimerázzal végeztük.

3. 4. A dolgozat elkészítése során használt oligonukleotid indító szekvenciák (primerek)

SNFA	5'-TTC CCA GCA G/AAA TT/AA TC/AT CTG G/CTG T-3'
SNFS	5'-AGC ATT/C CTT GG/AG ATC AG/AA TC-3'
SNF1BAL	5'-GGG AAT TCA TGG ACG GAA CAG CAG TGC AAG-3'
SNF1JOBB	5'-TCA AAG TAC GCG AAG CTG AGC A-3'
GALT	5'-GAC CAT CAA GTC AGC CGA AG-3'
GALK	5'-AGG TCA GAG CGT GGT GAT CT-3'
Gal4AD	5'-TTC GAT GAT GAA GAT ACC-3'

3. 5. Plazmidok és plazmid konstrukciók

pBluescript (SK+)	(Stratagene)
pGEX 2T	(Pharmacia)
pVA-1	(Clontech) Az egér p53 fehérjét kódoló cDNS a pGBT-7 vektorba klónozva Clontech pozitív kontrol csali plazmid)
pTD1-1	Az SV40 vírus nagy T antigénje a pGAD424 vektorba klónozva (Clontech pozitív kontrol préda plazmid)
pLL31	StubSNF1$_{1\text{-}512}$ pBluescript (SK+)-ban *Eco*RI-*Eco*RV helyen
pGAL4DBD	(Stratagene) az élesztő két-hibrid rendszer csali vektora
pGAL4AD	(Stratagene) az élesztő két-hibrid rendszer préda vektora
pLL32	StubSNF1 a pGAL4DBD-ben *Eco*RI-*Sma*I helyen (pDBD-StubSNF1)

pLL33	StubGAL83$_{4\text{-}289}$ a pGAL4AD-ben *Eco*RI-*Xho*I helyen (pAD-StubGAL83)
pLL34	ΔStubGAL83$_{174\text{-}289}$ a pGAL4AD-ben *Eco*RI-*Xho*I helyen (pAD-ΔStubGAL83)
pLL35	StubSNF1$_{1\text{-}512}$ pGAL4AD-ben *Eco*RI-*Xba*I helyen (pAD-StubSNF1)
pLL36	StubGAL83$_{4\text{-}289}$ pGAL4DBD-ben *Eco*RI-*Xho*I helyen (pDBD-StubGAL83)
pLL38	StubSNF1$_{1\text{-}362}$ pGAL4AD-ben. A pLL32 plazmid *Eco*RI-*Nco*I/feltöltve inszertjét a pGAL4AD vektor *Eco*RI-*Sma*I helyére klónozva (pAD-StubSNF1KD)
pLL39	StubSNF1$_{363\text{-}512}$ pGAL4AD-ben. A pLL32 plazmid *Nco*I/feltöltve- *Xba*I inszertje a pGAL4AD vektor *Eco*RI/feltöltve-*Xba*I helyére klónozva (pAD-StubSNF1KD)
pLL40	a StubGAL83$_{4\text{-}289}$ cDNS 5' végét reprezentáló RACE-PCR termék pBluescript (SK+) *Eco*RV helyére klónozva
pLL42	GST-StubSNF1$_{1\text{-}512}$ pGEX2T-ben *Bam*hI-*Sma*I helyére klónozva
pLL44	TRX-StubGAL83$_{25\text{-}289}$ pET32a+-ban *Bam*HI-*Xho*I helyére klónozva
ySNF4	Az élesztő SNF4 fehérje fúziós fehérjét képez a GAL4 aktivációs doménnel (Fields és Song, 1989)

3. 6. Növényi RNS és genomikus DNS izolálási technikák

A növényi RNS-t Stiekema és mtsai (1988) nyomán izoláltuk. A növényi szöveteket jégen tartott dörzscsészében, 500 µl kivonó pufferrel (0,2 M Na-acetát pH 5.2, 1% SDS, 10 mM EDTA) homogenizáltuk, majd fenolos és fenol-kloroformos extrakció után 2,5 M végkoncentrációjú LiCl oldatban csaptuk ki. Alkoholos mosást követően a steril vízben visszaoldott RNS-t formaldehid-agaróz gélen választottuk el (Sambrook és mtsai, 1989).

A növényi genomikus DNS izolálást Shure és mtsai (1988) által használt módszer alapján végeztük. 200-250 mg szövetet folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 700 µl izoláló pufferrel (0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA, 2% szarkozil, 0,5% SDS, 5 M urea, 20 mM $Na_2S_2O_5$) elkevertük. Fenol-kloroformos extrakció után a nukleinsavakat 0,7 térfogat izopropanollal csaptuk ki, majd sómentesítést követően RNáz A-t tartalmazó 1 × TE pufferben oldottuk vissza. 10 µg DNS-t emésztettünk a megfelelő enzimekkel. A nukleinsavak elválasztása és filterre rögzítése Sambrook és mtsai (1989) alapján történt.

3. 7. Nukleinsav jelzési technikák

Hibridizációhoz próbának agaróz gélből izolált DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést radioaktív α-P^{32} dCTP jelenlétében a random primer technikával végeztük Feinberg és Vogelstein módszere alapján (1983).

3. 8. Northern és Southern hibridizáció

A nukleinsavak (RNS, DNS) méretszerinti elválasztását és blottolását Sambrook és mtsai (1989) alapján végeztük. A Northern hibridizációhoz a membránokat (Hybond N+, Amersham-Pharmacia) Church pufferben hibridizáltuk (Churh és Gilbert, 1984). A Southern hibridizációt 65 °C -on végeztük (50 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl, 1% SDS, 10% dextrán-szulfát) egy éjszakán át. A membránokat először desztillált vízben 2 percig, majd 2×SSC, 1% SDS-t tartalmazó oldatban 30 percig 65 °C-on mostuk.

3. 9. Plakk hibridizáció

A cDNS klóntár (Bánfalvi és mtsai, 1996) rekombináns bakteriofágjait Sambrook és mtsai (1989) módszere alapján szaporítottuk. Összesen 150 000 fágot szélesztettünk ki három 17 cm átmérőjű

petricsészére. A rekombináns bakteriofágokat Hybond N+ (Amersham-Pharmacia) filterre blottoltuk. A filtereket a gyártó utasításait követve hibridizáltuk és mostuk. A pozitív jelet adó plakkok közelében lévő fágokat izoláltuk, újra szélesztettük, blottoltuk és hibridizáltuk, addig, amíg pozitív klónt egyedi plakként sikerült izolálni.

3. 10. cDNS-ek 5-vessző és 3-vessző végének izolálása RACE PCR-rel

A StubGAL83 cDNS 5' végének PCR-rel történő izolálásához templátként az eredeti plazmid formában lévő két-hibrid cDNS klóntárat használtuk. Az első PCR reakció során a GALT (168-187 pozíció a teljes hosszúságú cDNS-en), a második PCR során a GALK (139-158 pozíció) génspecifikus primert használtuk. Nem specifikus primerként a Gal4AD primert tettünk a reakciókba. A leghosszabb PCR termékeket pBluescript (SK+) plazmidba klónoztuk és nukleotidsorrendjüket meghatároztuk.

3. 11. Élesztő transzformáció

Az élesztő transzformáláshoz Schiestl és Gietz (1989) módszerét használtuk. Egy élesztőtelepet 50 ml leucinnal (70 mg/l) és hisztidinnel (35 mg/l) kiegészített SC (4,0 g/l Difco Yeast Nitrogen Base 4,0 g/l 12,0 g/l glucose 0.,50 g/l szintetikus komplett „drop out” mix) minimál táplevesbe oltottuk, és egy éjszakán át 30 °C-on 120 rpm-mel rázattuk. Ezzel a sejttömeggel inokuláltunk 300 ml leucinnal és hisztidinnel kiegészített SC minimál táplevest úgy, hogy a tenyészet optikai denzitása (OD) 0,1-0,2 között volt. A kultúrát OD=0,8-ig tenyésztettük, 300 rpm-mel centrifugáltuk majd a sejteket steril desztillált vízzel mostuk, és újra centrifugáltuk. Az élesztő pelletre 20ml transzformációs mixet (50% PEG MW3300, 100mM LiAc, 2mg/ml hővel denaturált heringsperma DNS, 100 □g cDNS könyvtár DNS-t adtunk. Először 30 °C-on 30 percig, majd 42 °C-on 20 percig inkubáltuk. Az élesztősejteket centrifugálással ülepítettük a transzformációs mixből, steril desztillált vízben felszuszpendáltuk és a megfelelő szelektív táptalajra kiszélesztettük.

3. 12. Élesztő két-hibrid rendszerrel végzett kísérletek

Munkánk során a Stratagene GAL4 élesztő két-hibrid rendszerével dolgoztunk.

Először a csali plazmiddal transzformáltuk az élesztőt, amely ezáltal triptofán prototróffá vált. Az így kialakított élesztő törzsbe juttattuk be egy ismételt transzformációval a pAD-GAL4 vektorban lévő levél bőrszövet cDNS klóntárat (préda plazmidok) (Ehrhardt és mtsai, 1996). Négy-hat nap inkubálás után a hisztidin jelenléte nélkül növekedni képes kolóniákat izoláltuk. A hisztidint növekedésükhöz nem igénylő kolóniák β-galaktozidáz aktivitását Jiang és Carlson (1996) által használt ún. "filter lift" méréssel vizsgáltuk. A vizsgálandó élesztő kolóniát kikentük egy hisztidinnel kiegészített SC minimál táptalajt tartalmazó petricsészére, amire előzőleg nylon membránt helyeztünk, majd 30 °C-on egy éjszakán át növesztettük. Az élesztő telepeket tartalmazó membránt 10 másodpercre folyékony nitrogénbe merítettük. A felengedett membránt ezután 0,3 mg/ml X-gal-t tartalmazó LacZ pufferrel (60 mM Na2HPO$_4$., 40 mM NaH2PO$_4$, 10 mM KCl, 1 mM MgSO$_4$, 50 mM 2-merkaptoetanol, pH 7.0) átitatott Whatmann papírra helyeztük. A β-galaktozidáz aktivitás kvantifikálásához Miller (1972) módszerét használtuk. A folyékony táplevesbe oltott élesztő kolóniákat 30 órán át 30 °C-on tenyésztettük, majd megmértük az OD-t. 100 µl tenyészethez 800 µl LacZ puffert és 1 csepp kloroformot adtunk. Ezután 160 µl ONPG oldatot (4 mg/ml ONPG LacZ pufferben oldva) mértünk bele, és mértük az eltelt időt. Amikor a minta színe sárgává kezdett válni, a reakciót 400 µl 1 M Na_2CO_3 leállítottuk és lecentrifugáltuk. A felülúszó optikai denzitását 420 és 550 nm-en megmértük. A β-galaktozidáz aktivitást a következő képlet segítségével számoltuk ki:

U= 1000x[(OD420)-(1.75xOD550)]/[(eltelt idő percben)x(térfogat cm^3-ben) x OD600]

A β-galaktozidáz aktivitást mutató élesztőkolóniákat folyékony tápoldatban elszaporítottuk, majd DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-sel *E. coli* DH5α

törzset transzformáltunk, és ampicillinre szelektálva megkaptuk a protein-protein interakcióban résztvevő préda cDNS-ek plazmidját hordozó sejteket.

3. 13. Bakteriális fúziós fehérje termeltetés és fehérje-fehérje kötés vizsgálata *in vitro*

A teljes fehérje kivonatot a következőképpen készítettük. 1-1 ml baktérium kultúrát lecentrifugáltunk és a pelletet 2×Laemmli pufferben feloldottuk. Öt percig forraltuk, majd a DNS-t centrifugálással eltávolítottuk.
A fúziós fehérjék termeltetését és az *in vitro* fehérje-fehérje kötés vizsgálatát Jiang és Carlson (1996) módszerei alapján végeztük el a következő módosításokkal:
(1) az indukált baktérium kultúrából származó baktérium pelletet jéghideg ST pufferben (30 mM Tris pH 8,0, 120 mM NaCl, 100 μg/ml lizozim) szuszpendáltuk fel.
(2) a TRX fúziós fehérjéket 300 mM imidazollal kiegészített ST pufferrel, kiegészítve eluáltuk.
(3) a fúziós fehérjéket az S-Tag Western blot kit (Novagen) segítségével mutattuk ki.

3. 14. Nukleotidsorrend meghatározás és elemzés

A klónozott DNS fragmentumok nukleotid sorrendjét didezoxi láncterminációs módszerrel határoztuk meg (Sanger és mtsai, 1977).

3. 15. Számítógépes programok

A dolgozat elkészítéséhez a Wisconsin GCG programcsomag BLAST, BLASTX, PILEUP, BOXSHADE programjait használtuk (Devereux és mtsai, 1984).

4. EREDMÉNYEK

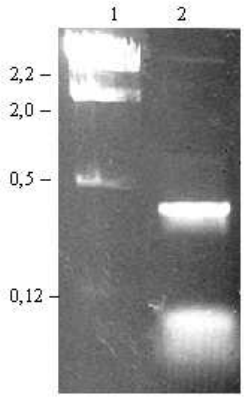
4. 1. SNF1 kináz cDNS izolálása és jellemzése *Solanum tuberosum*-ból

4. 1. 1. SNF1 kináz cDNS izolálása burgonyagumóból

Olyan faktorok izolálását és jellemzését tűztük ki célul, amelyek feltehetően részt vesznek a burgonya gumófejlődésének és a tartalék keményítő képzésének jelátviteli útvonalában. Munkánk kezdetekor nem állt rendelkezésre élesztő SNF1 kináz génjéhez homológ szekvencia *Solanum tuberosum*-ból. Mivel más magasabbrendű növényekből már írtak le SNF1 géneket, ezért megkíséreltük a burgonya SNF1 kináz izolálását homológia alapján polimeráz láncreakcióval.

Aminosav szintű szekvencia összehasonlításból megállapítottuk, hogy az eddig ismert növényi SNF1 kinázok 70-85%-os homológiát mutatnak egymáshoz. Továbbá a homológia sokkal magasabb (80-95%) a kináz katalitikus doménjén belül. A dohány NPK5, a rozs RKIN1, az *Arabidopsis thaliana* ATKIN1 és az árpa BKIN1, BKIN12 szekvenciák összehasonlítása alapján degenerált oligonukleotid indítószekvenciákat (primereket) terveztünk (SNFS, SNFA) a növényi SNF1 kinázok katalitikus doménjének III. és VIII. szubdoménjére. A PCR-t standard körülmények között végeztük, és templátként a *S. tuberosum* öt napos indukált sztóló RNS-ből készült cDNS könyvtár (Bánfalvi és mtsai, 1996) DNS-ét használtuk. A kb. 400 bázispár hosszú PCR terméket pBluescript (SK+) plazmid (4. 1. ábra) vektorba klónoztuk. A független klónokat reprezentáló baktérium telepekből plazmid DNS-t izoláltunk majd meghatároztuk a fragmentek nukleinsav sorrendjét, és összehasonlítottuk az ismert növényi SNF1 kinázok nukleotid szekvenciáival. A szekvencia összehasonlítás alapján megállapítottuk, hogy kétféle cDNS-t izoláltunk. A két csoportot reprezentáló LL20 és LL21-nek nevezett részleges cDNS klónokat analizáltuk tovább. A pLL20 plazmid által hordozott cDNS darab 388 bázispár hosszúságúnak bizonyult, és 88%-os homológiát mutatott a dohány NPK5 SNF1 kinázzal, míg a 388 bázispáros LL21 cDNS 99%-os

hasonlóságot mutatott a munkánk elvégzésével egy időben közölt PKIN1-nek nevezett (Man és mtsai, 1997) *Solanum tuberosum* SNF1 kináz megfelelő részeivel.



4. 1. ábra Parciális SNF1 cDNS-ek izolálása PCR-rel *S. tuberosum* gumó cDNS bankból.

1. csatorna: *Hind*III restrikciós endonukleázzal emésztett λ fág DNS, a fragmentek méretét kilobázisban (kb) adtuk meg. 2. csatorna: PCR-rel felszaporított részleges SNF1 cDNS-ek.

Az LL20 és az LL21 részleges cDNS-ek nukleotid sorrendjét a GAP programmal összehasonlítottuk és megállapítottuk, hogy a két cDNS 81%-os homológiát mutat egymáshoz (4. 2. ábra). A szekvencia összehasonlítások eredménye alapján az LL20 részleges cDNS-t választottuk további kísérleteink tárgyául.

4. 1. 2. Az LL20-nak megfelelő teljes hosszúságú cDNS izolálása

Az LL20 részleges cDNS-nek megfelelő teljes hosszúságú cDNS klónt a *S. tuberosum* indukált sztóló RNS-ből készített cDNS könyvtárból (Bánfalvi és mtsai, 1996) izoláltuk plakk hibridizáció segítségével. A cDNS könyvtár 200000 plakkját vizsgáltuk meg a radioaktívan jelölt LL20 cDNS-sel és

négy egyedi fágklónt izoláltunk. A λ fágklónokból a pBluescript részt és a cDNS-t *in vivo* helper fág segítségével plazmiddá konvertáltuk, majd meghatároztuk a cDNS-ek 5'-végének nukleotid sorrendjét.

```
LL20 1 ttcagcagataatttctggtgtggagtactgccatataaacatggtggtt 50
       ||||||||| ||| |||||||||||||||||||||  || |||||||||
LL21 1 ttcagcagattattgctggtgtggagtactgccataagaatatggtggtt 50

    51 catagagaccttaagcctgaaaacctccttctggactccaaatggaatgt 100
       ||| | ||||||||||||||| || || ||| ||||  | | | | |||||
    51 catcgggaccttaagcctgagaatctgcttttggatgcaagacgcaatgt 100

   101 gaagatcgcagattttggtttgagcaatatcatgcgcgatggtcattttc 150
       ||||| ||||||||||| ||| |||| |||||||| ||||| |||||||
   101 aaagatagcagattttggcttgggcaacatcatgcgagatggccattttc 150

   151 tgaagacaagttgcggaagcccaaactatgctgccccagaggttatatca 200
       ||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || |||||| | ||
   151 tgaagactagttgtggaagtccaaattatgcagctcctgaggttgtctct 200

   201 ggtaaattgtatgctggccctgaggtagatgtatggagctgtggtgttat 250
       || ||| | |||||||| ||||||||||||||| ||||| ||||| |||||
   201 gggaaactatatgctggtcctgaggtagatgtttggagttgtggcgttat 250

   251 tctttatgctcttctctgtggcacccttccatttgacgatgaaaacatac 300
        | ||||||||||| ||||| || ||||| || || || ||||| ||||
   251 cttatatgctcttctttgtggtacacttcctttcgatgacgaaaatatac 300

   301 ccaatctttttaagaaaataaagggtggatatattactctgcccagccat 350
       |||| ||||| ||||||||||| |||||      || || || || |||
   301 ccaacctttcaagaaaataaagagtggagtctacacccttccaagtcat 350

   351 ttatcagctggtgcgagggatttgattccaaggatgct             388
        | ||| ||   || ||||||||||| |||||||||||
   346 ctgtcacctttagctagggatttgataccaaggatgct             388
```

4. 2. ábra Az LL20 és az LL21 parciális cDNS-ek szekvenciáinak összehasonlítása.

A két cDNS nukleotid sorrendje 80%-os homológiát mutat egymáshoz. Az összehasonlítást a GAP programmal végeztük el.

A kapott szekvencia adatok alapján egyetlen cDNS klón bizonyult teljes hosszúságúnak, amit StubSNF1-nek neveztünk el. Az StubSNF1 cDNS

klónt szubklónoztuk, a szubklónok nukleotid sorrendjét meghatároztuk, majd összeállítottuk a StubSNF1 cDNS klón teljes nukleotid szekvenciáját és a belőle származtatott fehérje aminosav sorrendjét (4. 3. ábra) (Lakatos és Bánfalvi, 1997).

```
  1 MDGTAVQGTSSVDSFLRNYKLGKTLGIGSFGKVKIAEHTLIGHKVAVKIL  50
 51 NRRKIRNMDMEEKVSREIKILRLFMHGHISRLYEVIETPSDIYVVMEYVK 100
101 SGELFDYIVEKGRLQEDEARNFFQQIISGVEYCHINMVVHRDLKPENLLL 150
151 DSKWNVKIADFGLSNIMRDGHFLKTSCGSPNYAAPEVISGKLYAGPEVDV 200
201 WSCGVILYALLCGTLPFDDENIPNLFKKIKGGYITLPSHLSAGARDLIPR 250
251 MLIVDPMKRMTIPEIRLHPWFQAHLPRYLAVPPPDTMQQAKKIDEEILQE 300
301 VVKMGFDRNNLTESLRNRVQNEGTVPYYLLLDNRHRVSTGYLGAEFQESM 350
351 EYGYNRINSNEPLLPCWQRFPGIMDYQQAGARQFPIERKWALGLQSRAHP 400
401 REIMTEVLKALQELNVCWKKIGQYNMKCRWVPSVPGHHEGMGVNSMHGNQ 450
451 FFGDDSSIIENDGDTKLTNVVKFEVQLYQTREEKYLLDLQDQGSQFLFLD 500
501 LCAAFLAQLRVL                                       512
```

4. 3. ábra A StubSNF1 fehérje aminosav sorrendje

Az ATP kötő helyet (25-48. aminosav) sárgával, a sejtmag lokalizációs szignált (53-70. aminosav) lilával, az UBA domént (292-332. aminosav) zölddel, az AMPK T210-nak megfelelő T175-öt pirossal jelöltük.

4. 1. 3. Az StubSNF1 cDNS klón szekvencia analízise

A teljes hosszúságú StubSNF1 cDNS 1950 bázispárból áll. A leghosszabb nyitott leolvasási keret (ORF) egy 512 aminosav hosszúságú proteint kódol. A cDNS 5’ végén 197 bp-os, 3’ végén 215 bp-os nem-transzlálódó régió található. Az 512 aminosav hosszúságú fehérje N-terminálisán található a 262 aminosavból álló, 11 szubdomént tartalmazó protein kináz katalitikus domén (Hanks és Hunter, 1995). A katalitikus domén feltételezett ATP-kötő helye a 25-48. pozíció között helyezkedik el, amely a kináz katalitikus aktivitásában valószínűleg fontos szerepet játszik. Az NPK5 kináz ATP-kötő helyében található konzervatív lizin aminosav cseréje alaninra ugyanis katalitikus aktivitással egyáltalán nem rendelkező fehérjét eredményezett (Muranaka és mtsai, 1994). A StubSNF1 fehérje 53. és 70. aminosava között a két részből álló sejtmag-lokalizációs szignál

található, ami a StubSNF1 fehérje szelektív akkumulációját idézheti elő a sejtmagban.

Közvetlenül a katalitikus domén után a fehérje C-terminálisa felé az ún. ubiquitin asszociált domén (UBA domén) található (292-332 aminosav). Az UBA domén egy kb. 40 aminosavból álló, és megtalálható olyan számos fehérjében, amelyek bizonyítottan az ubiquitin úton degradálódnak (Hofmann és Bucher, 1996) (4. 3. ábra). Az StubSNF1 kináz mellett az *Arabidopsis thaliana* AKIN10, a dohány NPK5 és az élesztő SNF1 kináz is tartalmazza az UBA domént (Hofmann és Bucher, 1996).

A StubSNF1 proteint a BLAST (Basic Local Sequence Alignment Tool) számítógépes program segítségével összehasonlítottuk a Genbank adatbázisban található protein szekvenciákkal. A StubSNF1 protein a legmagasabb homológiát (89% azonosság, 92% hasonlóság) a dohány NPK5 protein kinázhoz (Muranaka és mtsai, 1994) mutatta. A burgonyagumóból izolált PKIN1 kináznak a StubSNF1-gyel való összehasonlítása során jóval alacsonyabb, 68% azonosságot és 73% homológiát kaptunk aminosav szinten. Az StubSNF1 és a szintén burgonyából izolált PKIN1 közötti nem túl magas homológia valószínűleg azt jelenti, hogy a két SNF1 kináz különböző szignál transzdukciós utakban vesz részt.

4. 2. A StubSNF1 kinázzal együttműködő StubGAL83 cDNS izolálása élesztő két-hibrid rendszerrel

A sejtekben végbemenő biokémiai folyamatokban meghatározó szerepet töltenek be a fehérje-fehérje kölcsönhatások. Egy fehérje funkciójának megismeréséhez sok fontos adatot szolgáltat a vele kölcsönhatásban lévő (együttműködő) fehérjék izolálása és analízise. Az élesztő két-hibrid rendszer egy viszonylag új módszer, amely *in vivo* körülmények között teszi lehetővé a protein-protein kölcsönhatások tanulmányozását. A két-hibrid rendszer egyik leggyakrabban használt alkalmazási területe egy ismert fehérjével kölcsönhatásban lévő partner(ek) azonosítása.

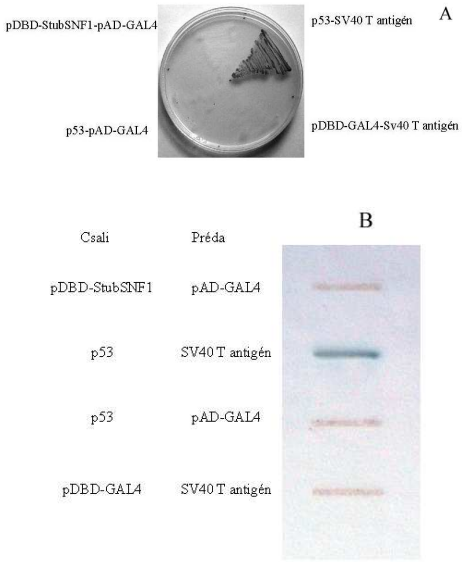
Mivel munkánk kezdetekor egyetlen növényi SNF1 kinázzal együttműködő fehérje sem volt ismert, az élesztő két-hibrid rendszerrel megkíséreltük a StubSNF1 protein kinázzal kölcsönható fehérjék izolálását.
A két-hibrid szűrés folyamata négy lépésből áll:

(1) a csali plazmid konstrukció elkészítése és riporter törzsbe való bejuttatása és ellenőrzése;
(2) a préda cDNS-eket hordozó cDNS könyvtár bejuttatása a csali plazmidot tartalmazó riporter törzsbe, majd a feltételezett interaktorok izolálása;
(3) a protein-protein interakció specifikusságának bizonyítása a két-hibrid rendszerben;
(4) a protein-protein interakció bizonyítása más módszer segítségével (pl. *in vitro* fehérje-fehérje kötés vizsgálattal).

4. 2. 1. A pDBD-StubSNF1 csali konstrukció létrehozása és ellenőrzése

A StubSNF1 cDNS klón 512 aminosavat kódoló teljes nyitott leolvasási keretének megfelelő DNS szakaszt PCR-rel felszaporítottuk. A PCR-hez használt SNF1BAL, a StubSNF1 ORF 5'-végéhez tapadó primer, egy *Eco*RI restrikciós hasítóhelyet is tartalmazott úgy, hogy az *Eco*RI hely által kódolt E és F aminosavak azonos leolvasási keretbe kerüljenek a StubSNF1 protein kódoló régiójával. A PCR terméket *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztettük, majd *Eco*RI-*Eco*RV helyre a pBluscript plazmidba klónoztuk (pLL31) és meghatároztuk teljes nukleotidsorrendjét. A StubSNF1 ORF-et a pLL31 plazmidból *Eco*RI és *Hind*III enzimekkel kivágtuk, majd a *Hind*III túlnyúló véget feltöltöttük, és a pGAL4DBD vektor (csali plazmid) *Eco*RI-*Sma*I helyeire klónoztuk. Így létrehoztuk a pLL32-nek nevezett, GAL4 DNS-kötő domén StubSNF1 fúziós proteint termelő konstrukciót (pDBD-StubSNF1). A pDBD-StubSNF1 plazmid által termelt fúziós protein N-terminálisán a GAL4 DNS kötő domén található. Ha a csali vektor által kódolt fehérje önmagában is képes transzkripciós aktivátorként működni, és így a riportergének (HIS3, LacZ) transzkripcióját iniciálni, akkor a fúziós fehérje élesztő két-hibrid rendszerben nem

használható. Ezért megvizsgáltuk a pDBD-StubSNF1 plazmidot hordozó élesztőtörzs növekedését hisztidin jelenlétében és hisztidint nem tartalmazó táptalajon is. Az élesztőtörzs csak a hisztidinnel kiegészített táptalajon növekedett és a kolóniák nem mutattak LacZ aktivitást sem. Ezzel szemben a pozitív kontrolként használt élesztőtörzs, ami az SV40 T-antigént és az egér p53 cDNS-t hordozta a megfelelő csali és préda vektorokba klónozva, képes volt hisztidin jelenléte nélkül növekedni, és jelentős LacZ aktivitást mutatott. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a pDBD-StubSNF1 konstrukció önmagában nem képes egyedül transzkripciós aktivátorként működni ezért a két-hibrid rendszerben csali fehérjeként használható. (4. 4. ábra). Ezután a pDBD-StubSNF1 plazmidot a YRG-2 élesztőtörzsbe transzformáltuk.



4. 4. ábra A pDBD-StubSNF1 csali konstrukció ellenőrzése az élesztő két-hibrid rendszerben.

A különböző csali és préda konstrukciókat a YRG-2 élesztőtörzsbe jutattuk. A transzformáns sejtek növekedését hisztidin mentes táptalajon teszteltük.(A). A β-galaktozidáz aktivitást az un. “filter lift” méréssel (Jiang és Carlson, 1996) határoztuk meg (B).

4. 2. 2. Az StubSNF1-gyel együttműködő fehérjék izolálása két-hibrid szűrés módszerrel

A pDBD-StubSNF1 csali konstrukciót tartalmazó élesztőtörzset a pADGAL4 vektorban lévő *Solanum tuberosum* levél bőrszövet RNS-ből készített cDNS klóntárral (préda plazmidok) (Ehrhardt és mtsai, 1997) transzformáltuk, és kb. 600 000 transzformánst kaptunk. Négy-hat nap inkubálás után 24, hisztidin hiányában is növekedni képes (HIS^+) kolóniát izoláltunk, majd a "filter lift" vizsgálattal megvizsgáltuk a kolóniák β–galaktozidáz aktivitását (Jiang és Carlson 1996). A 24 HIS^+ kolóniából nyolc telep bizonyult β–galaktozidáz pozitívnak. A HIS^+, $LacZ^+$ kolóniákból izolált préda plazmidok inszertjeinek 5'-végeinek nukleotid sorrendjét meghatároztuk, majd a BLASTX program segítségével összehasonlítottuk a Genbank adatbázisban található adatokkal. Az összehasonlítás eredményét a 4. 1. táblázat mutatja be.

4. 1. táblázat A két-hibrid szűréssel izolált cDNS-ek származtatott aminosav sorrendjéhez legmagasabb homológiát mutató fehérjék.

cDNS klón száma	**HOMOLÓGIA**
1	Patkány AMPK komplex β alegysége
2	Ismeretlen
3	Paradicsom izopropil-malát-dehidrogenáz
4	Patkány AMPK komplex β alegysége
5	Ismeretlen
6	Ismeretlen
7	Ismeretlen
8	Patkány AMPK komplex β alegysége

A szekvencia összehasonlítás alapján megállapítottuk, hogy a nyolc cDNS öt különböző géntermékет reprezentált. A nyolc klónból három egymással átfedő cDNS jelentős homológiát mutatott a patkány AMPK β alegységéhez (Thornton és mtsai, 1998), és az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 géncsalád tagjaihoz is (Jiang és Carlson, 1997). Jelen dolgozatban a két-hibrid szűréssel izolált többi cDNS klónnal a továbbiakban nem foglalkozunk, és az öt szekvenciát a Függelékben mutatjuk be.

Az AMPK β alegységéhez homológiát mutató cDNS-ek nukleinsav-sorrendjét meghatároztuk. Az 1024 bp hosszú és a két 516 bp hosszú cDNS megfelelő részei 100%-os homológiát mutattak egymáshoz, ezért a hosszabb cDNS-t StubGAL83-nak (pLL32), a rövidebb cDNS-t ΔStubGAL83-nak (pLL33) neveztük el.

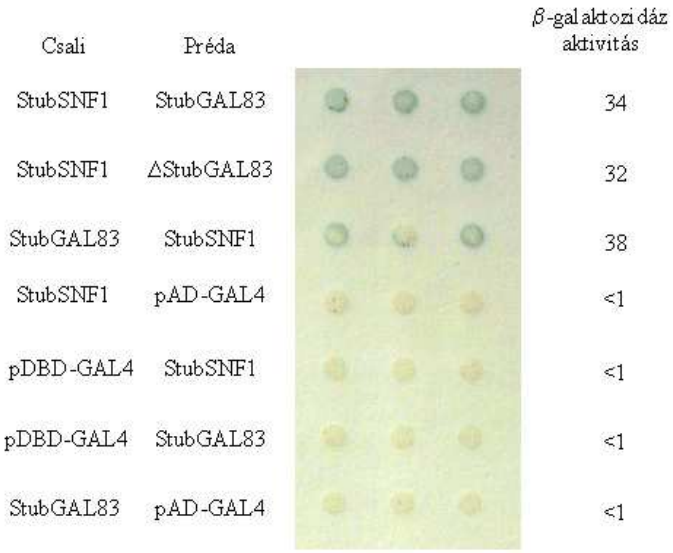
Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az élesztő két-hibrid rendszerrel izolált StubGAL83 és ΔStubGAL83 cDNS-ek valószínűleg az SNF1 protein kináz komplex adaptor alegységének a *Solanum tuberosum*-ban található homológja (Lakatos és mtsai, 1999)

4. 2. 3. A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék közötti kölcsönhatás bizonyítása a két-hibrid rendszerrel

Az élesztő két-hibrid rendszer számos előnye mellett egyetlen hátránya az, hogy viszonylag sok olyan pozitív klónt eredményez, amelyek valójában nem együttműködő partnerei a kérdéses fehérjének. Ezért egy fehérje-fehérje interakció ”valódiságát” minél többféleképpen be kell bizonyítani.

A két-hibrid rendszerben a fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakulását nem befolyásolhatja az, hogy egy adott fehérje DNS kötő- vagy aktivációs domén fúziós fehérjeként van jelen az élesztőben. Az együttműködés specifitását igazolja, ha a kölcsönható fehérjék fordított szereposztásban is ugyanolyan hatékonyan együttműködnek, mint az eredteti csali-préda rendszerben. Ezért StubSNF1 teljes kódoló régióját a pAD vektorba, a pAD-StubGAL83 plazmid által hordozott cDNS-t a pDBD vektorba klónoztuk, így létrehoztuk a pLL35 és a pLL36 plazmidokat. A konstrukciókat az

eredeti teszt-rendszernek megfelelő csali-préda (pDBD-StubSNF1, pAD-StubGAL83), illetve fordított kombinációban (pDBD-StubGAL83, pAD-StubSNF1) ko-transzformációval élesztőbe juttattuk, és a fehérjék kölcsönhatását a riportergének aktivitása alapján detektáltuk.



4. 5. ábra A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék együttműködnek az élesztő két-hibrid rendszerben.

A különböző csali és préda plazmid kombinációkat bejuttattuk a YRG-2 élesztőtörzsbe; a transzformáns sejtek β-galaktozidáz aktivitását szilárd táptalajon ún. „filter lift" méréssel (Jiang és Carlson, 1996), folyékony táplevesben az ONPG méréssel határoztuk meg (Miller, 1972). A folyékony táplevesben mért β-galaktozidáz aktivitást Miller egységben adtuk meg.

A fehérje-fehérje interakció kialakulásának alapfeltétele az, hogy mind a két kölcsönható partner jelen legyen az élesztősejtben. Ha csak az egyik fúziós fehérje van jelen és az "ellentétes" vektor üres (pl. pDBD-StubSNF1és pAD), akkor elvileg a fúziós fehérje önmagában nem működhet transzkripciós aktivátorként, így β-galaktozidáz aktivitást sem mérhetünk. Ezért negatív kontrolként a pDBD-StubSNF1-pAD, pDBD-

pAD-StubSNF1, pDBD-pAD-StubGAL83 és pDBD-StubGAL83-pAD kombinációkat is bejuttattuk az élesztőbe. Minden kombinációból három reprezentatív kolónia β-galaktozidáz aktivitását mértük szilárd táptalajon a β-galaktozidáz méréssel, folyékony tápoldatban az ONPG méréssel (Jiang és Carlson, 1996 és Miller, 1972). Eredményeinket a 4. 5. ábra mutatja be.

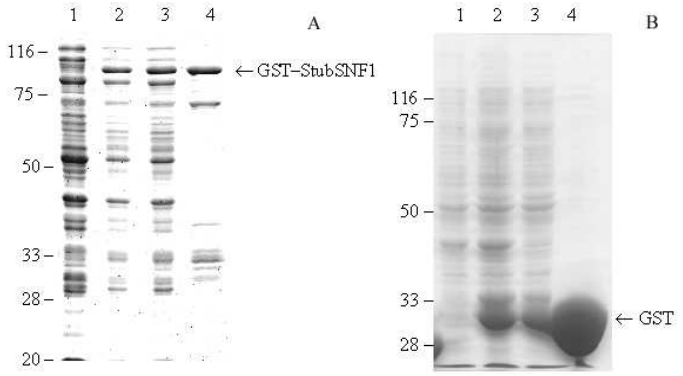
Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy fehérje-fehérje interakciót csak akkor detektáltunk, ha mindkét fúziós fehérje jelen volt az élesztőben (4. 5. ábra, 1, 3 sor). Az ONPG méréssel közel azonos erősségű protein-protein interakciót állapítottunk meg (34, 38 Miller egység) pDBD-StubSNF1, pAD-StubGAL83 és pDBD-StubGAL83, pAD-StubSNF1 transzformánsokban, ami azt jelenti, hogy a két fehérje kölcsönhatásának erősségét nem befolyásolja, hogy DBD vagy AD fúziós fehérjeként van-e jelen az élesztőben. Nem detektáltunk β-galaktozidáz (<1 Miller egység) aktivitást azokban a transzformáns élesztősejtekben, amelyek csak az egyik fúziós fehérjét kódoló plazmidot hordozták, tehát sem a StubSNF1, sem a StubGAL83 önmagában nem képes transzkripciós aktivátorként működni (4. 5. ábra, 4, 5, 6, 7 sor).

4. 2. 4. A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék közötti direkt interakció kimutatása *in vitro* kötési vizsgálattal

További kísérleteink során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék közvetlenül kapcsolódnak-e egymással, vagy interakciójuk egy harmadik, az élesztőben is jelen lévő fehérjét igényel. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a StubSNF1 és a StubGAL83 fehérjéket fúziós fehérjeként expresszáltattuk külön-külön *Escherichia coli* sejtekben, majd a fúziós fehérjéket affinitás és metál-kelát kromatográfiával izoláltuk, és kapcsolódásukat *in vitro* körülmények között vizsgáltuk.

A StubSNF1 cDNS teljes kódoló régióját a pGEX-2T vektorba klónoztuk (pLL42). A keletkezett fúziós fehérje N-terminálisán a glutation-S-transzferáz (GST), a C-teminálison a StubSNF1 fehérje található (GST-StubSNF1). A GST-StubSNF1 és pGEX-2T vektorokat *E. coli* BL21

törzsbe juttattuk, majd LB folyékony tápoldatban OD=1,0-ig tenyésztettük. A rekombináns fehérjék expresszióját 0,1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. Három órás indukció után a sejteket centrifugáltuk, szonikálással feltártuk, majd az oldható fehérjéket jéghideg ST pufferben extraháltuk. Az extraktumokból a GST-StubSNF1 és a kontrollként használt GST fehérjéket glutation-Sepharose oszlopon affintás-kromatográfiával közel homogenitásig tisztítottuk, majd a fúziós fehérjéket 20 mM redukált glutationt tartalmazó pufferben eluáltuk. A GST-StubSNF1 és GST fehérjék

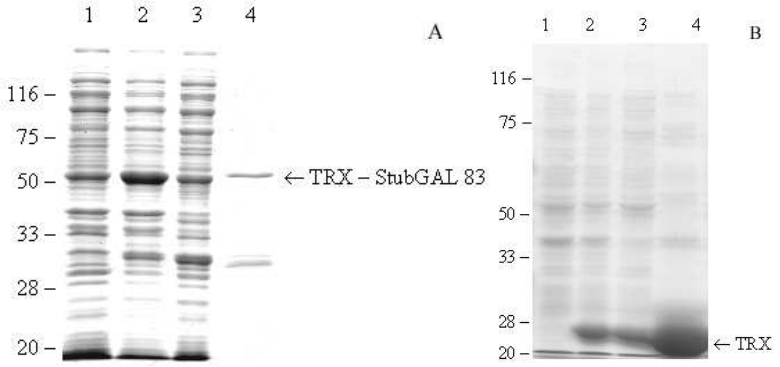


4. 6. ábra GST fúziós fehérjék termeltetése *E. coli*-ban, és a termelt fúziós fehérjék tisztítása affinitás kromatográfiával.

A fehérjekivonatokat és az izolált fúziós fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el. A molekulaméreteket kilodaltonban (kD) adtuk meg (A) A GST-StubSNF1 termeltetése és izolálása. 1. csatorna: indukálatlan baktérium kultúrából készített totál fehérjekivonat, 2. csatorna: 0.1 mM IPTG-vel indukált baktérium kultúrából készített totál fehérjekivonat, 3. csatorna: az indukált baktérium kultúrából ST pufferrel készített fehérjekivonat (oldható fehérjék), 4. csatorna: az oldható fehérjéket tartalmazó kivonatból affinitás kromatográfiával tisztított GST-StubSNF1. (B) A GST termeltetése és izolálása. 1-3. csatorna ua., mint (A), 4. csatorna: az oldható fehérjéket tartalmazó kivonatból glutation-Sepharose affinitás kromatográfiával tisztított GST.

termelődését poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A 4. 7. A. ábrán jól látható, hogy a GST-StubSNF1 egy kb. 85 kDa fehérjeként termelődik az *E. coliban*, amit affinitás kromatográfia segítségével kb. 60%-

os tisztaságig dúsítottunk. A 4. 6. B. ábrán a GST fehérje tisztítását mutattuk be. A StubGAL83 cDNS *Bgl*II-*Xho*I (25-289. aminosav) fragmentjét a pET32a+ vektorba klónoztuk (pLL44). A pET32 vektorban olyan fúziós fehérje termelésére van lehetőség, amelynek az N-terminálisán a 109 aminosavas tioredoxin (TRX) fehérje, a 15 aminosav hosszúságú S-tag és a 6 hisztidinből álló His-tag található. A TRX-StubGAL83 és pET32a



4. 7. ábraGST fúziós fehérjék termeltetése *E. coli*-ban, és a termelt fúziós fehérjék tisztítása metál-kelát kromatográfiával.

A fehérjekivonatokat és az izolált fúziós fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el. A molekulaméreteket kilodaltonban (kD) adtuk meg (A) A TRX-StubGAL83 termeltetése és izolálása. 1. csatorna: indukálatlan baktérium kultúrából készített totál fehérjekivonat, 2. csatorna: 1,0 mM IPTG-vel indukált baktérium kultúrából készített totál fehérjekivonat, 3. csatorna: az indukált baktérium kultúrából ST pufferrel készített fehérjekivonat (oldható fehérjék), 4. csatorna: az oldható fehérjéket tartalmazó kivonatból affinitás kromatográfiával tisztított TRX-StubGAL83. (B) A TRX termeltetése és izolálása. 1-3. csatorna ua., mint (A), 4. csatorna: az oldható fehérjéket tartalmazó kivonatból metál-kelát kromatográfiával tisztított TRX.

vektorokat *E. coli* BL21(DE3) törzsbe juttattuk, majd LB folyékony tápoldatban OD=0,6-ig tenyésztettük. A fehérjeexpressziót 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. Három órás indukció után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, feltártuk, majd az oldható fehérjéket jéghideg ST pufferben extraháltuk. A TRX-StubGAL83 és TRX fehérjéket nikkel-kelát kromatográfiás oszlopon részlegesen tisztítottuk, majd a

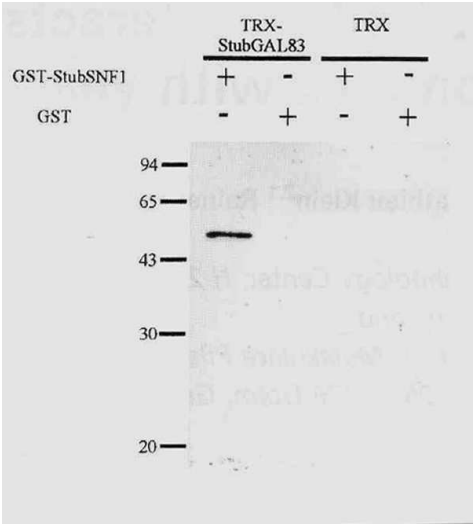
kötődött fehérjéket 300 mM imidazol tartalmú ST pufferrel eluáltuk. A rekombináns fehérje termelődését ebben az esetben is poliakriamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A 4. 7. A. ábrán láthatjuk, hogy a kb. 52 kD-os fehérjéként termelődő TRX-StubGAL83 fehérjét is közel homogenitásig tisztítottuk a nikkel-kelát kromatográfiás oszlopon. A 4. 7. B.. ábrán a TRX fehérje tisztítását mutatjuk be. Az eluátumok fehérje tartalmát Bradford méréssel határoztuk meg.

A tisztított GST-StubSNF1 és GST fehérjéket (2,5-2,5 μg) újra a glutation-Sepharose oszlopra kötöttük és a reakcióelegyhez mértünk 2,5 μg TRX-StubGAL83 és 5 μg TRX fehérjét, és a reakció elegyeket két órát át jégen inkubáltuk. A nem specifikusan kötődött fehérjéket ST pufferes mosással eltávolítottuk. A GST-StubSNF1 és GST fehérjékhez kötődő molekulákat eluáltuk, majd 12%-os poliakrilamid gélen történő elválasztás után a TRX tag-ot hordozó fehérjéket a TRX-tag-ben lévő S-tagot felismerő ellenanyag segítségével Western blottal detektáltuk. A 4. 8. ábrán látható, hogy a StubGAL83 kötődik a StubSNF1 fehérjéhez, ugyanis az oszlopra kötött GST-StubSNF1 visszatartotta a TRX-StubGAL83 fehérjét (1. oszlop). Nem alakult ki fehérje-fehérje kölcsönhatás a negatív kontrolként beállított GST-TRX-StubGAL83, GST-StubSNF1-TRX, GST-TRX kötési reakciókban.

In vitro eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a két-hibrid rendszerrel izolált StubGAL83 fehérje közvetlenül kötődik a StubSNF1 protein kinázhoz.

4. 3. A StubGAL83 cDNS 5’ végének izolálása PCR-rel

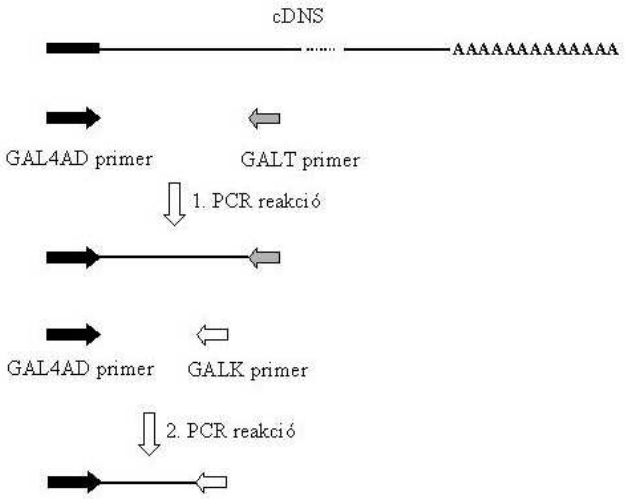
A két-hibrid rendszerrel izolált StubGAL83 cDNS klón egy 1024 bázispár hosszúságú stop kodont tartalmazó, azonban transzlációs start kodon nélküli csonka cDNS-nek bizonyult, ami egy 285 aminosav hosszúságú fehérjét kódol.



4. 8. ábra A StubSNF1 protein kináz együttműködése a StubGAL83 fehérjével *in vitro*.

A GST-StubSNF1 és GST fehérjéket glutation-Sepharose oszlopra kötöttük, majd együtt inkubáltuk a TRX-StubGAL83 és TRX fehérjékkel. A nem kötődött fehérjéket lemostuk, a kötött fehérjéket eluáltuk, majd 12%-os poliakrilamid gélen választottuk e,l és a TRX tagban lévő S-tag elleni antitesttel mutattuk ki.

A StubGAL83 csonka cDNS hiányzó 5’ végét PCR-rel szaporítottuk fel a két-hibrid kísérletekhez használt plazmid formában lévő cDNS könyvtárból (Ehrhardt és mtsai, 1996) (4. 9. ábra). A PCR-hez használt, a cDNS 5’ vége felé író GALT és GALK primereket a csonka StubGAL83 cDNS-re terveztük. A PCR-rel felszaporított részleges cDNS-t pBluescript (SK+) vektor *Eco*RV helyére klónoztuk (pLL40), majd meghatároztuk az inszert nukleotidsorrendjét. A szekvencia adatok alapján megállapítottuk, hogy a StubGAL83 cDNS-nek megfelelő mRNS 5’ végét szaporítottuk fel, mert a PCR termék és a StubGAL83 cDNS 120 bázispár hosszúságú átfedő része 100%-ban megegyezett, valamint a PCR termék a hiányzó, de feltételezett transzlációs start kodont is tartalmazta.



4. 9. ábraA StubGAL83 cDNS 5’ végének felszaporítása PCR-rel

Templátként levél bőrszövet két-hibrid cDNS könyvtárat használtuk. Az első PCR reakciót a GAL4AD és GALT primerekkel, a második PCR reakciót a GAL4AD és a GALK primerekkel végeztük.

4. 4. A teljes hosszúságú StubGAL83 szekvencia analízise

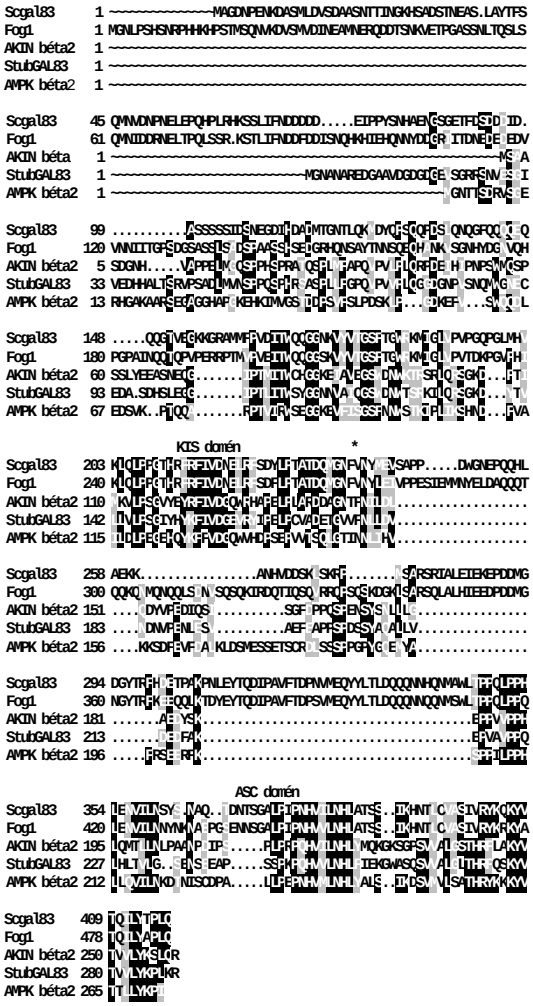
A teljes hosszúságú StubGAL83 cDNS 1071 bázispár hosszúságú, 5’ végén 37 bázispáros, 3’ végén 163 bázispáros nem-transzlálódó régiót tartalmaz. A StubGAL83 cDNS leghosszabb értelmes leolvasási kerete egy 289 aminosavas fehérjét kódol, aminek a molekulatömege 31,8 kDa.

A StubGAL83 cDNS által kódolt fehérjét a BLAST program segítségével összehasonlítottuk a Swissprot fehérje adatbázissal. Megállapítottuk, hogy a StubGAL83 fehérje homológiát mutat az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 géncsalád tagjaihoz, a humán AMPK kináz komplex béta alegységeihez, a *Kluyveromyces lactis* FOG1 fehérjéhez és az AKIN β1, AKIN β2 *A. thaliana* cDNS-ekhez. A páronkénti összehasonlítás alapján a StubGAL83 fehérje a legmagasabb homológiát az *A. thaliana*

AKIN β1 cDNS-hez mutatta aminosavszinten (51% aminosav azonosság, 62% a hasonló aminosavak aránya).

A StubGAL83 fehérje humán és *A. thaliana* homológjai közel azonos hosszúságúak, míg a *Saccharomyces cerevisiae*-ből származó GAL83 és a *Kluyveromyces lactis*-ból izolált FOG1 proteinek jóval hosszabbak. A hasonló régiók szemléletes bemutatása céljából a GAL83, FOG1, AMPKβ2, AKIN β1 és a StubGAL83 fehérjéket a PILEUP programmal egymáshoz illesztettük, és hasonló szakaszokat a BOXSHADE programmal kiemeltük (4. 10. ábra). Az összehasonlításban szereplő összes fehérjében két erősen konzerválódott szakaszt azonosítottunk, amelyek a StubGAL83 fehérjén a 104.-182. és a 220.-287. pozíciók között helyezkednek el. Az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 fehérjéken a két-hibrid rendszer segítségével azonosították azokat a régiókat, amelyek az SNF1 és SNF4 fehérjékkel való kapcsolódásban részt vesznek. Az ún. KIS domén felelős az SNF1 kinázzal, az ún. ASC domén felelős az SNF4 aktivátor alegységgel történő kötés kialakításáért (Jiang és Carlson, 1997). A szekvencia homológia alapján a StubGAL83 fehérje 104.-182. pozíciója között lévő régió a KIS doménnek, a 220. aminosavtól a 287. aminosavig terjedő fehérjeszakasz az ASC doménnek feleltethető meg. Az összehasonlításban szereplő fehérjék N-terminális része nem mutat szignifikáns homológiát egymáshoz, egyedüli hasonlóság közöttük az, hogy közvetlenül a transzlációs start kodon után membránlokalizáltságot biztosító mirisztoilációs szignált tartalmaznak.

A StubGAL83 fehérje homológjai meglehetősen konzerváltak más magasabbrendű növényekben, ugyanis számos a StubGAL83-hoz magas homológiát mutató EST-t találtunk a növényi EST adatbankban a BLAST program segítségével. Az *A. thaliana*-ból izolált AKIN β1 és AKIN β2 cDNS-ek jelentős homológiát mutatnak a StubGAL83-hoz. A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjéken végzett munkánkat és elért eredményeinket (Lakatos és mtsai, 1999) megerősíti Bouly és mtsai (1999) későbbi eredményei, mely szerint az AKIN β1 és AKIN β2 fehérjék együttműködnek az AKIN α1 SNF1 kinázzal és az AKIN γ alegységével (az *A. thaliana* SNF4 homológja) az élesztő két-hibrid rendszerben.



4. 10. ábra A StubGAL83 fehérjéhez magas homológiát mutató élesztő, emlős és növényi fehérjék illeszkedése a homológ szakaszok alapján.

Az azonos aminosavakat feketével, a hasonló aminosavakat szürkével jelöltük. Az összehasonlításban szereplő fehérjék: StubGAL83 *S. tuberosum*, ScGAL83 *S. cerevisiae*, FOG1 *Kluyveromyces lactis*, AKIN β2 *A. thaliana*, AMPK β2 humán. A KIS és ASC doméneket felirattal jelöltük.

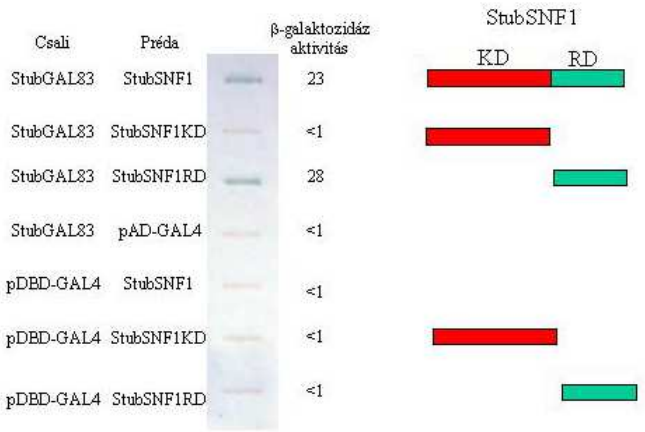
4. 5. A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék kapcsolódásában résztvevő domének azonosítása

A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék kapcsolódásában résztvevő doméneket az élesztő két-hibrid rendszerrel azonosítottuk. Először arra a kérdésre kerestünk válasz, hogy StubSNF1 fehérje katalitikus (KD) vagy regulátor (RD) doménjével kapcsolódik a StubGAL83 fehérjéhez. A kérdés megválaszolásához létrehoztuk a StubSNF1 kináz katalitikus (1-362. aminosavig,) és regulátor doménjét (363-512. aminosavig,) tartalmazó konstrukciókat a pAD két-hibrid vektorban (pLL38 és pLL39).

A StubSNF1 fehérje kináz és regulátor doménjét tartalmazó préda és a pDBD-StubGAL83 csali plazmid konstrukciókat páronként ko-transzformációval az Y190 élesztőtörzsbe juttattuk, majd a transzformáns kolóniák β-galaktozidáz aktivitását vizsgáltuk. (4. 11. ábra). Megállapítottuk, hogy a StubSNF1 kináz regulátor doménje hasonló erősséggel kapcsolódik a StubGAL83 fehérjéhez, mint a teljes StubSNF1 kináz, míg a StubSNF1 kináz katalitikus doménjét (KD) tartalmazó konstrukcióval nem kaptunk interakcióra utaló β-galaktozidáz aktivitást. Negatív kontrolként az élesztőbe transzformáltuk pDBD-StubGAL83-pAD, pDBD-pAD-StubSNF1, pDBD-pAD-StubSNF1KD, pDBD-pAD-StubSNF1RD plazmid kombinációkat. A negatív kontrollok esetében nem kaptunk β-galaktozidáz aktivitást.

Az StubSNF1 protein kinázzal élesztő két-hibrid rendszerben a 285 aminosav kódoló kapacitású StubGAL83 cDNS mellett a ΔStubGAL83 cDNS-t is izoláltuk. Az 516 bázispáros ΔStubGAL83 cDNS a teljes hosszúságú fehérje utolsó 124 aminosavát kódolja. A StubGAL83 és a ΔStubGAL83 összehasonlítása után megállapítottuk, hogy a két fehérjét kódoló cDNS az átfedő részeken 100%-ban megegyezik. Ezenkívül a szekvencia összehasonlítás alapján az is látható, hogy a ΔStubGAL83 protein az SNF1 kináz megkötésében szerepet játszó ún. KIS doménnek csak az utolsó 9 aminosavát tartalmazza (4. 10 ábra). Ennek ellenére kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a két-hibrid rendszerben a ΔStubGAL83 protein közel ugyanakkora erősséggel kötődött a StubSNF1

fehérjéhez, mint a KIS domént teljes egészében tartalmazó StubGAL83 fehérje (4. 5. ábra, 1, 2 sor). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a StubGAL83 fehérje esetében a homológia alapján azonosított KIS domén utolsó 9 aminosava is képes teljes értékű KIS doménként funkcionálni, vagy a KIS doménen kívül StubGAL83 fehérje más részei is részt vehetnek a StubGAL83 és a StubSNF1 közötti kötés kialakításában, de az is elképzelhető, hogy a két fehérje kapcsolódását egy harmadik, feltehetően, az élesztőből származó fehérje biztosítja.

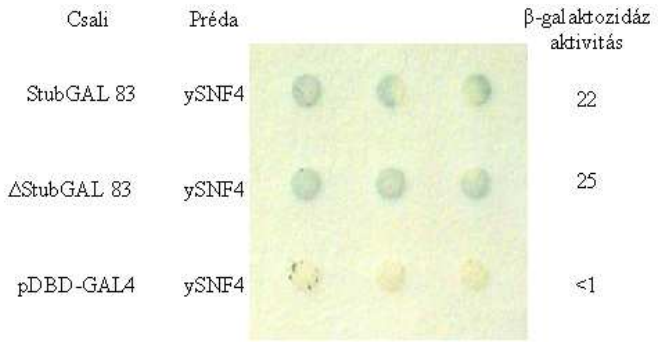


4. 11. ábra A StubSNF1 kináz a C-terminálisán lévő regulátor doménjével kapcsolódik a StubGAL83 fehérjéhez.

A különböző csali és préda plazmid kombinációkat bejuttattuk az Y190 élesztőtörzsbe, a transzformáns sejtek β-galaktozidáz aktivitását szilárd táptalajon az un. „filter lift” méréssel (Jiang és Carlson, 1996), folyékony táplevesben az ONPG méréssel határoztuk meg (Miller, 1972). A folyékony táplevesben mért β-galaktozidáz aktivitást Miller egységben adtuk meg. Az ábrán a katalitikus domént (KD) pirossal a regulátor domént (RD) zölddel jelöltük.

4. 6. A StubGAL83 fehérje együttműködik az élesztő SNF4 fehérjével

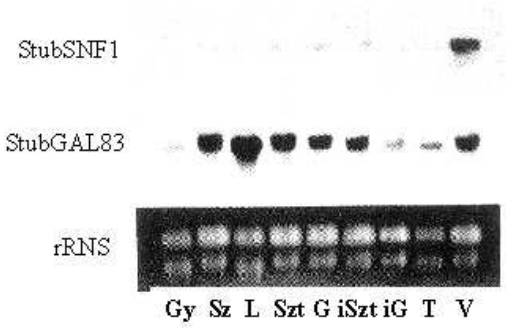
Az élesztőben az SNF1 protein kináz komplexet a katalitikus alegység (SNF1), az aktivátor alegység (SNF4) és az adaptor alegység (SIP1/SIP2/GAL83) alkotja. Munkánk során az élesztő két-hibrid rendszer segítségével izoláltuk a StubGAL83 fehérjét, ami feltehetőleg az élesztő SNF1 komplex adaptor alegységének felel meg. Továbbá a StubGAL83 fehérjében megtalálhatók az SNF1 kinázt kötő ún. KIS és az SNF4 proteint kötő ún. ASC doménhez homológ szakaszok is. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az élesztőhöz hasonlóan az SNF1 kináz a növények esetében is egy három alegységből álló komplexként működik. Ennek a hipotézisünknek az ellenőrzésére megvizsgáltuk, hogy a StubGAL83 és a ΔStubGAL83 képes-e együttműködni élesztő SNF4 (ySNF4) fehérjével a két-hibrid rendszerben. Az 4. 12. ábrán látható kombinációban az élesztőbe jutattuk a különböző csali és préda konstrukciókat, majd meghatároztuk a transzformáns kolóniák LacZ aktivitását.



4. 12. ábra A StubGAL83 és a ΔStubGAL83 fehérje együttműködik az élesztő SNF4 fehérjével az élesztő két-hibrid rendszerben.

A különböző csali és préda plazmid kombinációkat bejuttattuk a YRG-2 élesztőtörzsbe, a transzformáns sejtek β-galaktozidáz aktivitását szilárd táptalajon az ún. „filter lift” méréssel (Jiang és Carlson, 1996), folyékony táplevesben az ONPG méréssel határoztuk meg (Miller, 1972). A folyékony táplevesben mért β-galaktozidáz aktivitást Miller egységben adtuk meg.

A kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a StubGAL83 és a ΔStubGAL83 fehérjék kötődnek az élesztő SNF4 fehérjéhez (25 és 22 Miller egység). A 4. 10. ábrán lévő SNF1 komplexek adaptor alegységeinek összehasonlításából egyértelműen látszik, hogy az emlős, az élesztő és növényi adaptor alegységek a legnagyobb homológiát a fehérjék C-terminálisán lévő ASC doménben mutatják, így érthető a StubGAL83 és az élesztő SNF4 fehérjék hatékony együttműködése az élesztő két-hibrid rendszerben. Mivel a StubGAL83 fehérje hatékonyan képes együttműködni az élesztő SNF4 fehérjével két-hibrid rendszerben, ezért azt feltételezzük, hogy a növényekben az SNF1 kináz komplex, az emlős AMPK és az élesztő SNF1 komplexhez hasonlóan, három alegységből áll (Lakatos és mtsai, 1999).



4. 13. ábra A StubSNF1 és a StubGAL83 cDNS-ek által kódolt gének expressziójának vizsgálata Northern blottal a *S. tuberosum* különböző szerveiben.

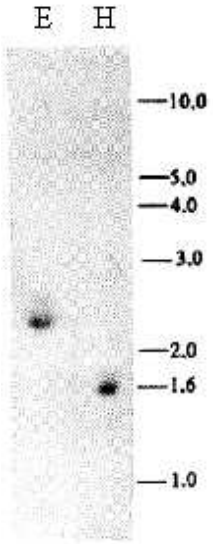
A membránt először a StubGAL83, majd a StubSNF1-nek megfelelő radioaktívan jelölt DNS próbával hibridizáltuk. Gy: gyökér, Sz: szár, L: levél, Szt: sztóló, iSzt: *in vitro* nevelt sztóló, iG: *in vitro* nevelt gumó, G: gumó, T: termés, V: virág

4. 8. A StubGAL83 kópiaszámának meghatározása

4. 7. A StubGAL83 és a StubSNF1 expressziójának összehasonlítása

A gének funkciójának megismerésében segítségünkre lehet az, ha ismerjük időbeli és térbeli expressziós mintázatukat. Ezért megvizsgáltuk a StubGAL83 és a StubSNF1 expresszióját Northern hibridizációval a *S. tuberosum* különböző szerveiben. Próbaként először a ΔStubGAL83 cDNS-

t, azután az StubSNF1 kódoló régióját tartalmazó pLL31 cDNS *Eco*RI-*Xho*I fragmentjét használtuk. A StubGAL83 cDNS-nek megfelelő gén a legerősebb expressziót a burgonya levelében, szárában és virágjában mutatta. Közepes erősségű expressziót detektáltunk a gumóban, a sztólóban, a virágban, az in vitro indukált sztólóban és gumóban, továbbá gyenge expressziót a termésben és a gyökérben. A StubSNF1 a burgonya virágában erősen, a többi vizsgált szervében northern hibridizációval alig kimutatható mértékben expresszál (4. 13. ábra).



4. 14. ábra A StubGAL83 kópiaszámának meghatározása Southern blottal

A *S. tuberosum* DNS-t *Eco*RI (E) és *Hin*dIII restrikciós endonukleázokkal emésztettük meg. Próbaként a ΔStubGAL83 cDNS *Eco*RI-*Xho*I fragmentjét használtuk. A DNS marker méretét kilobázisban (kb.) adtuk meg.

4. 8. A StubGAL83 kópiaszámának meghatározása

Southern hibridizációval meghatároztuk a StubGAL83 cDNS-nek megfelelő gén kópiaszámát *S. tuberosumban*. Az *Eco*RI és *Hin*dIII enzimekkel emésztett genomikus DNS-t filterre vittük, és a radioaktívan jelölt 516 bázispár hosszúságú ΔStubGAL83 cDNS-t használtuk próbaként. Az autoradiogrammon az *Eco*RI emésztésben egy kb. 2,5 kb-os, a *Hind*III emésztésben egy kb. 1,6 kb-os fragmentet detektáltunk. Ez arra utal, hogy a StubGAL83 egy kópiában van jelen a *S. tuberosum* genomjában.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5. 1. A StubSNF1 protein kináz

Munkánk során a *Solanum tuberosum* indukált sztóló cDNS könyvtárból izoláltunk egy eddig burgonyából nem ismert proteint kinázt kódoló cDNS-t, és StubSNF1-nek neveztünk el. A StubSNF1 cDNS által kódolt fehérje 65-90%-os homológiát mutatott az eddig izolált növényi SNF1 kinázokhoz, továbbá kináz doménje 60-65%-ban hasonlít az emlős AMPK és az élesztő SNF1 protein kináz megfelelő részeihez. A rendelkezésre álló adatok alapján megállapítottuk, hogy a StubSNF1 fehérje az SNF1 protein kináz család tagja Lakatos és Bánfalvi, 1997).

Számítógépes analízissel, és szekvencia összehasonlításokkal a StubSNF1 fehérjében azonosítottuk a funkció szempontjából fontos doméneket. A StubSNF1 protein kináz N-terminálisán a katalitikus domén, a C-terminálisán regulátor domén található. Azonosítottuk a 362 aminosavból álló kináz domén 11 szubdoménjét, a kináz doménben lévő ATP-kötő helyet (benne az erősen konzerválódott lizin aminosavat) és a VIII. szubdoménben a lévő erősen konzervált treonin aminosavat (175. aminosav) (Hanks és Hunter, 1995) (4. 3. ábra).

A kináz doménben lévő ATP-kötő hely esszenciális a fehérje protein kináz aktivitása szempontjából. Az élesztő SNF1 és a dohány NPK5 protein kinázok ATP-kötő helyében a nagyon konzervált lizin bármilyen más aminosavra történő cseréje a katalitikus funkció megszűnésével jár (Celenza és Carlson, 1986; Muranaka és mtsai, 1994). Érdemes azonban megemlíteni, hogy az ATP-kötő helyben mutáns SNF1 kináz a két hibrid rendszerben erősebben kötődik a REG1 (az SNF1 negatív regulátora, a protein foszfatáz 1 regulátor alegysége) fehérjéhez, mint a vad típusú SNF1 protein (Ludin és mtsai, 1998).

Az élesztő SNF1 kináz szabályozásának pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert. Azonban a tisztított élesztő SNF1 kináz inaktiválható protein-foszfatázzal és reaktiválható AMPKK kinázzal

(Wilson és mtsai, (1996). Továbbá, az élesztő SNF1 kináz VIII. szubdoménjében lévő treonin aminosav (T210) esszenciális a kináz aktivitáshoz *in vitro* és *in vivo* körülmények között is (Estruch és mtsai, 1992). Valószínűleg a 210. pozícióban lévő treonin az SNF1 kináz szabályozásában részt vevő protein kinázoknak és protein-foszfatázok célpontja. Ezt támasztják alá Ludin és mtsai (1998) eredményei, amelyek szerint az SNF1 kináz és negatív regulátora, a REG1 fehérje, együttműködik a két-hibrid rendszerben (is). Azonban fehérje-fehérje interakció nem detektálható a 210. pozícióban treonin helyett alanint tartalmazó SNF1 mutáns és a REG1 között. Ennek két oka lehet: (1) a 210. pozícióban lévő foszforilált treonin szükséges az SNF1-REG1 kapcsolat kialakulásához, (2) a treonin foszforilálódása idéz elő olyan konformációs változást az SNF1 proteinben, amely lehetővé teszi a REG1 fehérje kapcsolódását. Az élesztő SNF1 fehérjében lévő T210 a számítógépes összehasonlítás alapján a 175. pozícióban lévő treoninnak felel meg a StubSNF1 fehérjében (4. 3. ábra).

A StubSNF1 regulátor doménjében közvetlenül a katalitikus domén után a fehérje C-terminálisa felé az ún. UBA domén (Ubiquitin Associated Domain) található (292.-332 aminosav) (Hofmann és Bucher, 1996). Valószínűleg az SNF1 protein életidejének pontos szabályozása fontos szerepet játszik az élettani hatás kifejtésében. Ezt a feltételezést támaszthatja alá közvetett úton az a tény, hogy a humán AMPK α2 fehérje C-terminálisán egy PEST protein-degradációs domén konszenzusához nagyon hasonló szekvencia található. A PEST szekvenciát tartalmazó fehérjék szintén ubiquitinálódnak és a 26S proteoszómán keresztül bomlanak le. A humán AMPK α2 proteinben lévő PEST szekvencia részt vesz az AMPK α2 fehérje életidejének szabályozásában, ugyanis a PEST szekvencia deletálásával a csonka AMPK fehérje életideje a négyszeresére emelkedett (Crute és mtsai, 1998).

5. 2. StubGAL83 cDNS a növényi SNF1 komplex összekötő alegysége

A SNF1 proteinnel együttműködő fehérjék izolálása és jellemzése fontos adatokat szolgáltathat az SNF1 kinázoknak a növényi sejtben

betöltött szerepéről. Ezért az élesztő két-hibrid rendszerrel megkíséreltük a StubSNF1 kinázzal együttműködő fehérjék izolálását. Kísérleteink során a StubGAL83-nak elnevezett cDNS klónt izoláltuk. A StubSNF1 és a StubGAL83 fehérjék kapcsolódásának specifikusságát a két-hibrid rendszerrel (4. 5. ábra), a két fehérje közvetlen interakcióját in vitro körülmények között bizonyítottuk be (4. 8. ábra).

Kísérleteink során arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a StubSNF1 fehérje a katalitikus vagy a regulátor doménjével kapcsolódik a StubGAL83 fehérjéhez. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a StubSNF1 az élesztő SNF1 proteinhez hasonlóan a regulátor doménjével kapcsolódik az adaptor alegységhez (Jiang és Carlson, 1997) (4. 9. ábra).

Megállapítottuk, hogy az általunk izolált StubGAL83 fehérje az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 és az AMPK komplex β alegységének növényi homológja (4. 10. ábra) (Lakatos és mtsai, 1999). Az élesztőben és az emlősökben is több, az SNF1 kináz komplex összekötő alegységnek megfelelő fehérje található (SIP1/SIP2/GAL83, AMPK β1, β2) (Hardie és mtsai, 1998). Az élesztő és az emlős komplex összekötő alegység fehérjék a KIS doméntől a fehérje C-terminális végéig magas homológiát mutatnak egymáshoz, azonban az N-terminálisuk jelentős mértekben eltér. Ezért azt feltételezték, hogy az SNF1 kináz komplex a különböző összekötő alegységekkel alternatív módon épülhet fel, és így különböző jelátviteli utakban vehet részt. Az AMPK β1 és β2 gének expresszióját különböző emberi szervekben vizsgálva azt találták, hogy az AMPK β1 minden szervben közel egyforma erősséggel fejeződik ki, azonban az AMPK β2 a szívben és a vázizomzatban erősen, míg más szövetekben egyáltalán nem expresszál. Az AMPK β1 és β2 fehérje mennyisége szoros összefüggést mutatott a génexpressziós adatokkal (Thornton és mtsai, 1998). Valószínűleg egy adott szövetben a különböző AMPK β alegységek aránya határozza meg az AMPK komplex alegység szerkezetét.

Az *A. thaliana*-ból Bouly és mtsai (1999) homológia alapján izoláltak két olyan cDNS-t is, amelyek jelentős homológiát mutattak a SIP1/SIP2/GAL83 és az AMPK β fehérjékhez. Az AKIN β1 és AKIN β2 közel azonos szinten expresszált az *A. thaliana* különböző szerveiben,

valamint hatékonyan működött együtt az AKIN α1 SNF1 kinázzal az élesztő két-hibrid rendszerben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *A. thaliana*-ban (növényekben) az élesztőhöz és az emlősökhöz hasonlóan az SNF1 komplex különböző adaptor alegységekkel alternatív módon épülhet fel.

Az élesztő SNF1 kináz komplex adaptor alegysége a fehérje N-terminálisával juttathatja a szubsztrát molekulákat a katalitikus alegység felé. Ezért az alternatív módon felépülő SNF1 komplexek szubsztráspecificitása és ezáltal a funkciója is különbözhet. Erre a feltételezésre Carlson és munkacsoportja kísérletes bizonyítékot is szolgáltatott. Korábbi kísérleteik során az élesztő SNF1 kinázzal a (többek között) SIP4 transzkripciós aktivátort izolálták a két-hibrid rendszerben (Jiang és mtsai, 1992). Azonban fehérje-fehérje interakciót nem tudtak detektálni a SNF1-SIP4 fehérjék között a *gal83* mutáns élesztőtörzsben, míg a *sip1*, *sip2* mutánsokban az SNF1 és a SIP4 fehérjék együttműködtek. Továbbá, a két-hibrid rendszerben a SIP4 fehérje együttműködött a GAL83 fehérje N-terminális szakaszával, de nem tudott kapcsolatba lépni sem a SIP1, sem a SIP2 fehérjével (Vincent és Carlson, 1999). Ezekkel az eredményekkel szoros kapcsolatban állnak Carlson és munkatársai további megfigyelései is. A SIP1/SIP2/GAL83 fehérjék sejten belüli lokalizációját vizsgáltak élesztőben. A SIP1/SIP2/GAL83 géneket egyenként a GFP kódoló régiójával fuzionáltatták, és egyenként expresszáltatva őket az élesztő sejtekben megvizsgálták a fúziós fehérjék elhelyezkedését. Megállapították, hogy a SIP1 és SIP2 fehérjék inkább az élesztősejt citoplazmájában találhatók. Glükóz represszáló körülmények között a GAL83 fehérje szintén a citoplazmában található, azonban de-represszáló körülmények között a sejtmagba vándorol. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottak, hogy a SIP1és SIP2 fehérjék feltehetőleg a citoplazmában található fehérjék (feltehetőleg metabolikus enzimek) poszt-transzlációs modifikációjának szabályozásában vesznek részt, míg a GAL83 fehérje a sejtmagban lévő fehérjék, többek között a SIP4 transzkripciós faktor, foszforilációs állapotát szabályozzák a változó környezeti körülmények hatására (Vincent és mtsai, 2001).

5. 3. Az SNF1 komplex a növényekben is három tagból épül fel

Az SNF1 kinázok az eukarióta sejtben egy háromtagú komplexben működnek. A komplexet a katalitikus (SNF1, α), az aktivátor (SNF4, γ) és az összekötő (SIP1/SIP2/GAL83, β) alegységek építik fel (Hardie és mtsai, 1998) (2. 1. ábra). A katalitikus és az aktivátor alegység az összekötő alegységen keresztül kapcsolódik össze. Az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 fehérjéken a két-hibrid rendszer segítségével meghatározták a katalitikus és az aktivátor alegységek kötőhelyeit (Jiang és Carlson, 1997). Az SNF1 kötéséért felelős KIS doménnek és az SNF4 fehérjével való kötés kialakításáért felelős ASC doménnek megfelelő szekvenciák az emlős AMPK β és a StubGAL83 fehérjékben is megtalálhatók (4. 11. ábra), és magas szintű homológia állapítható meg közöttük. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a növényi SNF1 kinázok is az élesztő és emlős rendszerekhez hasonlóan három tagból álló komplexben működhetnek a növényi sejtekben is. A két-hibrid szűrés kísérleteink során nem sikerült burgonya SNF4 homológot izolálni, ezért hipotézisünk ellenőrzéseképpen megvizsgáltuk, vajon a StubGAl83 és az élesztő SNF4 (ySNF4) fehérjék kapcsolatba lépnek-e az élesztő két-hibrid rendszerben. A vártnak megfelelően a StubGAL83 együttműködött az élesztő SNF4-gyel (4. 12. ábra), ugyanis az élesztő, emlős és növényi SNF1 komplex összekötő alegységek ASC doménjei magas szintű homológiát mutatnak egymáshoz (4. 10. ábra) (Lakatos és mtsai, 1999).

Abe és mtsai (1994) bab növényből izoláltak egy cDNS-t, ami jelentős homológiát mutatott az élesztő SNF4 és az emlős AMPK γ fehérjékhez. Nem sokkal eredményeink publikálása (Lakatos és mtsai, 1999) után jelent meg az *A. thaliana*-ból homológia alapján izolált AKIN γ cDNS-ről szóló közlemény. Az AKIN γ szignifikáns homológiát mutatott az élesztő SNF1 komplex aktivátor alegységéhez (SNF4), és együttműködött az AKIN α1 továbbá az AKIN β1 és β2 fehérjékkel az élesztő két-hibrid rendszerben, ez ismét bizonyítja, hogy a növényi SNF1 komplex is katalitikus, aktivátor és adaptor alegységekből épülnek fel (Bouly és mtsai, 1999).

5. 4. A SNF1 kinázok lehetséges szerepe növényekben

Az SNF1 kinázok egy nagyon ősi, konzervált protein kináz család tagjai, feltehetőleg minden eukarióta élőlényben megtalálhatók.
Az élesztő SNF1 kináz alapvető szerepet játszik a glukóz represszálható gének de-represszálásában, valamint a peroxiszóma biogenezis (Simon és mtsai, 1992), a sporuláció (Hubbard és mtsai, 1992), és a flokkuláció (Kuchin és mtsai, 2002) szabályozásában is.

Az AMPK az emlőssejtek energiaellátottságának monitora. Ha a sejtben az AMP/ATP arány egy bizonyos szint fölé emelkedik, akkor az AMPK aktiválódik, serkenti energiatermelő folyamatokat, míg az energiaigényes felépítő folyamatokat gátolja (Hawley és Hardie, 2002).

A növényi SNF1 kinázok biológiai szerepéről nem sok információ áll rendelkezésünkre. A biológiai funkció vizsgálatához szükséges *snf1* mutáns növény előállítására tett kísérletek sikertelennek bizonyultak. Ennek oka lehet az *snf1* mutáns növény életképtelensége, vagy a növényi SNF1 gének kópiaszámában megfigyelhető redundancia. Például az *A. thaliana* genomjában három különböző SNF1 gén található. Ha e gének termékei helyettesítik egymást, abban az esetben csak a hármas mutánsnak lehet fenotípusa.

Mivel a növényi SNF1 kinázok szignifikáns szekvencia homológiát mutatnak az élesztő SNF1 kinázhoz, ezért felmerül a kérdés, vajon a szekvencia homológia mellett van-e funkcionális hasonlóság az élesztő és a növényi SNF1 kinázok között.

Az első növényből izolált SNF1 kináz a rozsból származó RKIN1 visszaállította az *snf1* élesztőtörzs eredeti fenotipusát, az RKIN1 cDNS-t termelő *snf1* mutáns élesztőtörzs fel tudta használni az etanolt és a glicerint (Alderson és mtsai, 1991). Hasonló komplementációs kísérleteket végeztek a dohányból izolált NPK5 protein kinázzal is. Az NPK5 protein kináz helyreállította az élesztő *snf1* mutánsban a vad fenotípust, így a komplementált törzs szacharózon tenyésztve a vad típushoz mérhető invertáz aktivitást mutatott (Muranaka és mtsai, 1994). Ezen kívül az NPK5 ugyanúgy szabályozódott az élesztőben, mint az endogén SNF1 kináz,

mivel a két-hibrid rendszerben az élesztő SNF1 proteinhez hasonló módon tudott fehérje-fehérje kapcsolatot kialakítani az élesztő SNF4 fehérjével (Jiang és Carlson, 1996). A komplementációs és az élesztő két-hibrid rendszerrel elért eredmények azt mutatják, hogy a növényi SNF1 kinázok képesek ellátni az élesztő SNF1 kináz feladatát. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a növényi sejtekben is létezik egy hasonló szignál transzdukciós út, ami a szénhidrát metabolizmus szabályozásában vesz részt.

A legtöbb adat az *A. thaliana* SNF1 kinázokról áll rendelkezésünkre. Az *A. thaliana* AKIN10 és AKIN11 SNF1 kinázok hatékonyan együttműködnek a PLR1 fehérjével. Továbbá megállapították, hogy a PRL1 gátolja az AKIN10 és AKIN111 fehérjék foszforilációját (aktiválódását) *in vitro* és *in vivo* is, amiből arra következtettek, hogy a PRL1 az SNF1 kinázok negatív regulátora, így a PRL1 fehérjéje és az élesztő HXK2, REG1 és GLC7 (az élesztő SNF1 negatív regulátorai) fehérjéi funkcionálisan megfeleltethetőek egymásnak (Bhalerao és mtsai, 1999). Az *A. thaliana prl1* mutánsában továbbá számos glükóz és szacharóz represszálható gén de-repressziója következik be. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *A. thaliana* SNF1 kinázok a szénhidrát metabolizmus transzkripciós szintű szabályozásában vesznek részt, ugyanígy szabályozza az élesztő SNF1 kináz az alternatív szénforrások lebontásáért felelős géneket is (Németh és mtsai, 1998, Bhalerao és mtsai 1999).

A másik növényi SNF1 kináz, amelynek (egyik) funkcióját meghatározták, a burgonyából izolált PKIN1 volt. A PKIN1 cDNS-t burgonyagumóból izolálták (Man és mtsai, 1998), és a PKIN fehérje 68%-os aminosav azonosságot és 73%-os hasonlóságot mutatott a StubSNF1 cDNS által kódolt fehérjéhez. A PKIN1 gént antiszensz orientációban expresszáltatták burgonyagumóban, és így az SNF1 kinázaktivitás lecsökkent. A StubSNF1 és a PKIN1 között olyan nagy a szekvencia különbözőség, hogy Southern blottal nem detektáltak közöttük kereszthibridizációt, ezért feltehetőleg a maradék kinázaktivitásért a StubSNF1 és esetleg még más ismeretlen SNF1 kináz(ok) felelősek. A PKIN1 antiszensz növényekben az alacsonyabb SUSY1 (szacharóz

indukálható szacharóz-szintáz) aktivitást mértek a gumóban és a levélben is. A PKIN1 a SUSY1 gént transzkripciós szinten szabályozza ugyanúgy, mint az élesztő SNF1 kináz az alternatív szénforrások lebontásáért felelős géneket. Azonban a transzgénikus növények gumóiban a SUSY1 aktivitás nem csökkent olyan nagymértékben, hogy bármilyen fenotípusos változást okozott volna (Purcell és mtsai, 1998).

Kísérletes munkánk későbbi szakaszában StubSNF1 cDNS-t antiszenz orientációban expresszáló transzgénikus burgonya vonalakat hoztunk létre, és a gumó szénhidrát metabolizmusban résztvevő enzimek expresszióját vizsgáltuk a transzgénikus növényekben. Annyit már bizonyosan állíthatunk, hogy a SUSY1 gén szabályozásában a StubSNF1 protein kináz nem változott meg, ugyanis az antiszenz StubSNF1cDNS-t hordozó transzgénikus növények levelében a SUSY1 expressziója a vad típushoz képest nem változott meg (Lakatos és Bánfalvi, nem közölt eredmény). Ezért úgy gondoljuk, hogy a *S. tuberosum*ból eddig izolált StubSNF1 és PKIN1 protein kinázok feltehetőleg két különböző szignál transzdukciós út irányításában vesznek részt.

5. 5. Új tudományos eredmények

1. Izoláltuk a StubSNF1 cDNS-t, egy új SNF1 kinázt *Solanum tuberosum*-ból.
2. Elsőként izoláltunk növényi SNF1 kinázzal együttműködni képes fehérjét. Kimutattuk, hogy a StubGAL83 cDNS által kódolt fehérje specifikusan képes együttműködni a StubSNF1 fehérjével.
3. A StubGAL83 jelentős homológiát mutatott az élesztő SNF1 és emlős AMPK protein kináz komplexek összekötő (adaptor-β) alegységeikhez. Eredményeink azt mutatják, hogy a növényi SNF1 kinázok az élesztő SNF1 és emlős AMPK-hoz hasonlóan más fehérjékkel komplexeket alkotva működhetnek a növényi sejtekben.
4. Megállapítottuk, hogy ugyanazok a domének vesznek részt a StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék közötti kapcsolat kialakításában, mint az SNF1 komplex katalitikus és adaptor alegységeinek esetében.

5. Bizonyítottuk, hogy a StubGAL83 fehérje hatékonyan együttműködik az élesztő SNF4 (aktivátor-γ) fehérjével az élesztő két-hibrid rendszerben, és valószínűsíthetjük, hogy a növényi sejtekben lévő SNF1 kináz komplexek az élesztő SNF1 és az emlős AMPK protein kináz komplexekhez hasonlóan három alegységből (katalitikus-α, adaptor-β, aktivátor-γ) épülhetnek fel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az SNF1 protein kináz család tagjai fontos szerepet játszanak az eukarióta sejtek metabolikus folyamatainak irányításában, a rendelkezésre álló energiaforrás minőségének és mennyiségének figyelembevételével szabályozzák a sejtben zajló lebontó és felépítő folyamatokat.

Az élesztő SNF1 protein kináz transzkripciós szinten szabályozza a glükóz-represszálható és a glikogén (tartalék tápanyag) felhalmozásban résztvevő géneket. Az élesztő SNF1 komplex három alegységből – katalitikus-α, adaptor-β, aktivátor-γ – épül fel. Az élesztő és növényi SNF1 kinázok között szignifikáns szekvencia homológia van, valamint a növényi SNF1 kinázok komplementálják az élesztő *snf1* mutáns fenotípust, ezért felmerül a kérdés, vajon a szekvencia homológia mellett van-e funkcionális hasonlóság az élesztő és növényi SNF1 kinázok között.

Célul tűztük ki SNF1 protein kinázok és a vele együttműködő fehérjék izolálását és jellemzését *Solanum tuberosum*-ból.
Burgonya indukált sztóló cDNS bankból izoláltuk a StubSNF1-nek nevezett cDNS-t. A StubSNF1 jelentős homológiát mutat az SNF1/AMPK géncsalád tagjaihoz.

Az élesztő két-hibrid rendszerben a StubSNF1 fehérjét csaliként használtuk fel és így izoláltuk a StubGAL83-nak nevezett cDNS-t. A StubGAL83 cDNS által kódolt fehérje szignifikáns homológiát mutatott az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 és az emlős AMPK β1, és β2 fehérjékhez, amikről már bizonyították, hogy az SNF1/AMPK kináz komplexek összekötő (adaptor) alegységeként funkcionálnak. A StubSNF1 és StubGAL83 közötti protein-protein interakciót *in vitro* kísérlettel is megerősítettük. Konzervatív fehérje-fehérje interakciót detektáltunk a StubGAL83 és az élesztő SNF4 között.

Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a StubSNF1 protein kináz a *S. tuberosum*ban komplexet képez a StubGAL83 fehérjével. Mivel a StubGAL83 és az élesztő SNF4 közötti interakció konzerválódott, ezért azt gondoljuk, hogy a növényi SNF1 komplex is három alegységből épül fel. Munkánk során megtettük az első lépéseket a StubSNF1 protein kináz

funkcionális vizsgálata felé. A feltételezett SNF1komplex két tagjának izolálásával lehetőség nyílik antiszenz és túlexpresszáló növények előállítására, amikkel pontos képet kaphatunk SNF1 kináz komplex tartalékkeményítő felhalmozásban és a gumóképzésben betöltött szerepéről.

ABSTRACT

The SNF1 protein kinases are widely conserved in eukaryotes. *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 gene is a serine/threonine protein kinase required for expression of glucose-repressible genes in response to glucose deprivation. SNF1 is also known to be involved in other functions such as glycogen accumulation, sporulation and peroxisome biogenesis, taking part of a general mechanism through which yeast cells respond to carbon source starvation by activating protective systems against different types of stresses.

Tuberisation of potato is elicited by high concentration of sucrose and coincidences with starch accumulation. Previous studies on yeast and mammals showed that the conserved SNF1 family is the key regulator of metabolism in the yeast and mammalian cells, and similar functions can be expected in plants

To unravel the role of SNF1 kinases in tuberisation and accumulation of starch we isolated and characterised an SNF1 kinase cDNA from potato tuber. We have used StubSNF1 as bait in a yeast two-hybrid system to screen for potato cDNAs encoding proteins that bind to StubSNF1. Three overlapping cDNAs, two different in size, were isolated. DNA sequence analysis revealed that they were orthologues of the yeast GAL83/SIP1/SIP2 genes and their mammalian counterparts, AMPK β subunits. The direct interaction between the potato cDNA clone, designated StubGAL83, and StubSNF1 was shown by *in vitro* binding assay. Based on Southern and northern hybridisations StubGAL83 exists in a low copy number in the potato genome and is highly, however, organ-specifically expressed in potato. In contrast, StubSNF1 possesses low transcript levels in each organ except of flower.

We demonstrated here that StubGAL83 can also interact with yeast SNF4 in a yeast two-hybrid system suggesting that plant SNF1 kinases may function in complexes similar to those detected in yeast and mammals.

M1. Irodalomjegyzék

Abe H., Kamiya Y., Sakurai A. (1995) A cDNA Clone Encoding Yeast SNF4-Like Protein (Accession No.U40713) from *Phaseolus vulgaris* L. (PGR95-126). *Plant Physiology*. 110: 336

Alderson A., Sabelli P.A., Dickinson J.R., Cole D., Richardson M., Kreis M., Shewry P.R., Halford N.G. (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(19):8602-5

Alepuz P.M., Cunningham K.W., Estruch F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Molecular Microbiology* 26(1):91-8

Bhalerao R.P., Salchert K., Bako L., Okresz L., Szabados L., Muranaka T., Machida Y., Schell J., Koncz C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9):5322-7

Bánfalvi Z., Molnár A., Molnár G., **Lakatos L.**, Szabó L. (1996) Starch synthesis, and tuber storage protein genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and in *Solanum brevidens*. *FEBS Letters* 383(3):159-64

Beg Z.H., Stonik J.A., Brewer H.B. Jr (1978) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(8):3678-82

Bouly J.P., Gissot L., Lessard P., Kreis M., Thomas M. (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant Journal* (5):541-50

Carling D., Clarke P.R., Zammit V.A., Hardie D.G. (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *European Journal of Biochemistry* 186(1-2):129-36

Carlson M., Osmond B.C., Botstein D. (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98(1):25-40

Celenza J.L., Carlson M. (1984) Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecullar and Cellular Biology* 4(1):49-53

Celenza J.L., Eng F.J., Carlson M. (1989) Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 9(11):5045-54

Celenza J.L., and Carlson M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233:1175-1180.

Church G.M., and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1991-1995.

Clarke P.R., Hardie D.G. (1990) Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO Journal* 9: 2439-2446

Crute B.E., Seefeld K., Gamble J., Kemp B.E., Witters L.A. (1998) Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273(52):35347-54

Davies S.P., Carling D., Hardie D.G. (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *European Journal of Biochemistry* 186(1-2):123-8

Davies S.P., Sim A.T.R., Hardie D.G., (1990) Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry* 187:183-190

Devereux J, Haeberli P, Smithies O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research* 12(1 Pt 1):387-95

Dyck J.R.B., Gao G., Widmer J., Stapleton D., Fernandez C.S., Kemp B.E., Witters L.A. (1996) Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry* 271(30):17798-803

Ehrhardt T., Zimmermann S., and Müller-Röber B. (1997) Association of plant K^+-ion channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Letters*. 409, 166-170

Estruch F., Treitel M.A., Yang X., Carlson M. (1992) N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* 132:639-50

Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (1999) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414(6861):271-6

Farras R., Ferrando A., Jasik J., Kleinow T., Okresz L., Tiburcio A., Salchert K., del Pozo C., Schell J., Koncz C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO Journal* 20(11):2742-56

Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analitycal Biochemistry* 132(1):6-13

Ferrer A., Caelles C., Massot N., Hegardt F.G. (1985) Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochemical and Biophysical Reasearch Communications* 132:497-504

Fields S., Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-6

Flick J.S., Johnston M. (1990) Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10(9):4757-69

Gyuris J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75(4):791-803

Hanks S.K.; Hunter T. (1995) Protein kinases. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal* 9: 576-96 (1995)

Hardie D.G., Carling D., Sim A.T. R. (1889) Th e AMP activated protein kinase-a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Science* 14:20-23

Hardie D.G., Carling D., Halford N. (1994) Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Seminars in Cellular Biology* 5(6):409-16

Hardie D.G., Carling D. (1997) The AMP-activated protein kinase: A fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry* 246(2):259-73

Hardie D.G., Carling D., Carlson M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual Reviews of Biochemistry* 67:821-55

Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D., Hardie D.G. (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271(44):27879-87

Hawley S.A., Hardie D.G., (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays* 12:1112-9

Hofmann K., Bucher P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in Biochemical Sciences* (5):172-3

Hubbard E.J., Yang X.L., Carlson M. (1992) Relationship of the cAMP-dependent protein kinase pathway to the SNF1 protein kinase and invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 130(1):71-80

Jiang R., and Carlson M. (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes and Development*. 10:3105-3115.

Jiang R., and Carlson M. (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and Cellular Biology* (4):2099-106

Kuchin S., Vyas V.K., Carlson M. (2002) Snf1 Protein Kinase and the Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate FLO11, Haploid Invasive Growth, and Diploid Pseudohyphal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 22(12):3994-4000

Kudo N., Barr A.J., Barr R.L., Desai S., Lopaschuk G.D (1996) High rates of fatty acid oxidation during hyperfusion ischemic hearts are assiciated with the decrease in malonyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17513-17520

Lakatos L., Bánfalvi Z., (1997) Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding an SNF1 Protein Kinase Homologue (Accesion No. U83797) from *Solanum tuberosum* (PGR97-043). *Plant Physiol*ogy. 113: 1004

Lakatos L., Klein M., Hofgen R., Banfalvi Z. (1999) Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant Journal* (5):569-74

Lesage P., Yang X., Carlson M. (1994) Analysis of the SIP3 protein identified in a two-hybrid screen for interaction with the SNF1 protein kinase. *Nucleic Acids Research* 22(4):597-603

Lesage P., Yang X., Carlson M. (1996) Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology* (5):1921-8

Ludin K., Jiang R., Carlson M. (1998) Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6245-50

Mackintosh R.W., Davies S.P., Clarke P.R., Weekes J., Gillespie J.G., Gibb B.J., Hardie D.G. (1992) Evidence for a protein kinase cascade in higher

plants. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *European Journal of Biochemistry* 209(3):923-31

Man A.L., Purcell P.C., Hannapel U., Halford N.G. (1997) Potato SNF1 related kinase. molecular clonng, expression analysis and peptide kinase activity measurments. *Plant Molecular Biology* 34:31-43

Michelhill K.I., Stapleton D., Gao G., House C., Michell B., Katsis F., Writters L.A., Kemp B.E. (1994) Mammalian AMP-acivated kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast SNF1 protein kinase *Journal of Biological Chemistry* 269: 2361-2364

Miller J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Moore F., Weekes J., Hardie D.G. (1991) Roles of the AMP-activated and cyclic-AMP-dependent protein kinases in the adrenaline-induced inactivation of acetyl-CoA carboxylase in rat adipocytes. *European Journal of Biochemistry* 199: 691-697

Munday M.R., Campbell D.G., Carling D Hardie D.G., (1988) Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase.
European Journal of Biochemistry 187: 331-338

Muranaka T., Banno H., Machida Y. (1994) Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of S. cerevisiae *Molecular and Cellular Biology* 14(5):2958-65

Németh K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kálmán Z., Stankovic-Stangeland B., Bakó L., Mathur J., Ökrész L., Stabel S.,

Geigenberger P., Stitt M., Redei G.P., Schell J., Koncz C. (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes and Development* 12(19):3059-73

Purcell P.C., Smith A.M. and Halford N.G. (1998). Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant Journal*, 14, 195-202.

Sambrook J., Fritch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M.. (1977) Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature 265(5596):687-95

Schiestl R.H. and Gietz R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*. 5-6, 339-346.

Shure M., Wessler S., Fedoroff N. (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* 35, 225-233.

Simon M., Binder M., Adam G., Hartig A. Ruis H. (1992) Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by ADR1, SNF1 (CAT1, CCR1) and SNF4 (CAT3). *Yeast* 4, 303-309.

Stiekema W.J., Heidkamp F., Dirkse W.G., Van Beckum J., De Haan P., Bosh T. Lauwerse J.D. (1988) Molecular cloning and analysis of four tuber specific mRNAs. *Plant Molecular Biology* 11, 255-269.

Thonton C., Snowden M.A., Carling D. (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12443-12450

Tamai K.T, Liu X., Silar P., Sosinowski T., Thiele D.J. (1994) Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Molecular and Cellular Biology* 14(12):8155-65

Trumbly, R.J. (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 6: 15-21

Tu J., Carlson M. (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 14(23):5939-46

Yang X., Hubbard E.J., Carlson M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257(5070):680-2

Vincent O., Carlson M. (1999) Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO Journal* 18(23):6672-81

Vincent O., Townley R., Kuchin S., Carlson M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism *Genes and Development* 15(9):1104-14

Winder W.W., Hardie D.G., (1996) Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *American Journal of Physiology* 270: 299-304

Wilson W.A., Hawley S.A., Hardie D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated

by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biology* 6(11):1426-34

White M.A. (1996) The yeast two-hybrid system: forward and reverse. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(19):10001-3

Woods A., Munday M.R., Scott J., Yang X.L., Calrson M., Carling D. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 19509-15

Woods A., Cheung P.C.F., Smith F.C., Davidson M.D. Scott J., Beri R.K. Carling C. (1996) Characterisation of AMP-activated β and γ subunits: assembly of the heterotrimetric complex in vitro..*Journal of Biological Chemistry* 271: 10282-10290

Woods A, Salt I., Scott J., Hardie D.G., Carling D. (1996) The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Letters* 397(2-3):347-51

Woods A., Azzout-Marniche D., Foretz M., Stein S.C., Lemarchand P., Ferre P., Foufelle F., Carling D. (2000) Characterization of the role of AMP-activated kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase *Molecular and Celluler Biology* 20:6704-6711

Zhang W., DePaoli Roach A.A., Roach P.J. (1993) Mechanisms of multisite phosphorylation and inactivation of rabbit muscle glycogen synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304:219-225

M2. A két-hibrid szűréssel izolált cDNS klónok szekvenciái.

2. számú szekvencia:

```
ggatattaatacaactacttctacttggcaaattcttaactgctagtatgg
tattgatgaaacccactttctccctccctccgatccctttttcccgcgaaa
tctcggcagcttctggatttctcgattcctgttcttgtagcgaactctacc
tgcaagaca
```

Nem mutat jelentős homológiát ismert szekvenciákhoz

3. számú szekvencia:

```
gaattcggcacgagagttgaagatgtgatcatttcaacacactgccagaag
atcttgggctttctactgccaacaccttagctggagcatgtgcaggtgcag
acaattggaagtgaccatcaatggaattggtgaaagtaggcatccatcaga
tggaatgctaaaacacaaagatacatatgagattatatctctgaagatatg
ggcttaatcgtgctaataaatctggtattgtctcgggaaactcagtggg
```

Paradicsom izopropil-malát-dehidrogenáz

5. számú szekvencia:

```
tgttgctggggaacannacccggccacccatgaagagaacaagcagcatgc
agaattcactttacatctcaatctcaataatcctgaccctaattcttctca
tagtaattacaataatccattcgatcctcacaatcctatttcacctgcaaa
cactcagcaacagctagatcaacaacgtttattcaccgcacctaaaaccgt
tcgcagaacgcgtaaa
```

Nem mutat jelentős homológiát ismert szekvenciákhoz.

6. számú szekvencia:

```
aaatgacaaatgtaccatacagattcctgacagtaaatttgatcgaatgag
attccaatgatgcttggcaagggtttgagggccccatgggtgcatgtggat
agagaggacataactgattcttctgatcaaaatgccactgctggtgcatct
agccgaacctgatctg
```

Nem mutat jelentős homológiát ismert szekvenciákhoz.

7. számú szekvencia:

```
catttcaacacactgccagaacgatcttgggctttctactgccaacaccttg
ctggagcatgtgcaggtgcaagacaattggaagtgaccatcaatggaattg
```

Nem mutat jelentős homológiát ismert szekvenciákhoz.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet Dr. Bánfalvi Zsófiának, aki több mint öt évig irányította munkámat, Dr. Burgyán József témavezetőmnek támogatásáért és Dr. Tora Lászlónak, aki lehetővé tette számomra, hogy laboratóriumában dolgozatomhoz kísérleteket végezzek. Köszönöm Dr. Silhavy Dánielnek és Dr. Kerényi Zoltánnak a dolgozat elkészítéséhez nyújtott segítséget.