SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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

....

A iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

ELŐZMÉNYEK, KITŰZÖTT CÉLOK

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 floémtranszport 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikrobiológiai technikák

Munkánk során a baktériumokat és az élesztőket a szokásos alaptechnikákkal oltottuk, inokuláltuk, szaporítottuk. Az élesztő transzformációt a LiAc-os intakt sejttranszformációs módszerrel végeztük. Munkánk során a Stratagene élesztő két-hibrid rendszerét használtuk a gyártó által javasolt módszer alapján. A kolóniák β-galaktozidáz aktivitását szilárd táptalajon az ún. "filter lift" méréssel vizsgáltuk. A β-galaktozidáz aktivitást folyékony táplevesben ONPG méréssel határoztuk meg. Kísérleteink során *Solanum tuberosum* cv. Keszthelyi 855 vonalat használtuk.

Molekuláris biológiai eljárások

A molekuláris biológiai módszerek közül a plazmidizolálást, az agaróz gélelektroforézist, a restrikciós endonukleázzal történő emésztést és a molekuláris klónozást, a polimeráz láncreakciót, a

Southern és Northern hibridizációt, nukleinsav-sorrend meghatározást a molekuláris biológiában általánosan használt, valamint a gyártó által javasolt módszer szerint végeztük.

Nukleinsav jelzési technikák

Hibridizációhoz próbának agaróz gélből izolált DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést radioaktív α-P^{32} dCTP jelenlétében a random primer technikával végeztük

Biokémiai eljárások

A GST és TRX fúziós fehérjéket *E. coli* BL21 és *E. coli* BL21(DE3) törzsekben végeztük, majd a gyártó által javasolt módszer szerint izoláltuk. A TRX fúziós fehérjéket az S-tag elleni antitestet használva Western blottal mutattuk ki. Az *in vitro* fehérje-fehérje kötés vizsgálatot 30mM Tris pH 8,0, 120mM NaCl tartalmú pufferben végeztük.

Számítógépes programok

A dolgozat elkészítéséhez a Wisconsin GCG programcsomag BLAST, BLASTX, PILEUP, BOXSHADE programjait használtuk.

EREDMÉNYEK

Aminosav szintű szekvencia összehasonlításból megállapítottuk, hogy az eddig ismert növényi SNF1 kinázok 70-85%-os homológiát mutatnak egymáshoz. A homológia sokkal magasabb (80-95%) a kináz katalitikus doménen belül. Ezért a dohány NPK5, a rozs RKIN1, az *Arabidopsis thaliana* ATKIN1 és az árpa BKIN1, BKIN12 szekvenciák összehasonlítása alapján degenerált primereket terveztünk a növényi SNF1 kinázok katalitikus doménjének III. és VIII. szubdoménjére. A PCR-hez templátként a *Solanum tuberosum* öt napos indukált sztóló RNS-ből

készült cDNS könyvtár DNS-ét használtuk. A kb. 400 bázispár hosszú PCR terméknek megfelelő teljes hosszúságú cDNS-t izoláltuk, nukleinsav és a belőle származtatott fehérje aminosav sorrendjét meghatároztuk. A StubSNF1 protein a legmagasabb homológiát (89% azonosság, 92% hasonlóság) a dohány NPK5 protein kinázhoz mutatta. A burgonyagumóból izolált PKIN1 kináznak a StubSNF1-gyel való összehasonlítása során jóval alacsonyabb, 68% azonosságot és 73% aminosav kaptunk aminosav szinten. Az StubSNF1 és a szintén burgonyából izolált PKIN1 közötti nem túl magas homológia valószínűleg azt jelentheti, hogy a két SNF1 kináz különböző szignál transzdukciós utakban vesz részt.

Mivel munkánk kezdetekor egyetlen növényi SNF1-vel együttműködő fehérje sem volt ismert, megkíséreltük az StubSNF1 protein kinázzal kölcsönható fehérjék izolálását. Az együttműködő fehérjéket meghatározó cDNS-ek azonosítását élesztő két-hibrid rendszerrel kíséreltük meg.

A két-hibrid szűrés folyamata során a következő lépéseket hajtottuk végre:

Létrehoztuk a pDBD-StubSNF1 csali plazmid konstrukciót, majd riporter törzsbe juttattuk. A préda cDNS-eket hordozó cDNS könyvtárat bejuttattuk a csali plazmidot tartalmazó riporter törzsbe, majd izoláltuk a feltételezett interaktorokat. A feltételezett interaktorok közül három átfedő cDNS a patkány AMPK β alegységéhez és az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 géncsalád tagjaihoz mutatott homológiát. Ezt a cDNS-t StubGAL83-nak neveztük el. A StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék interakciójának specifikusságát a két-hibrid rendszerben bebizonyítottuk.

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 *Escherichia coliban*, a fúziós fehérjéket affinitás kromatográfiával izoláltuk és kapcsolódásukat in vitro körülmények között vizsgáltuk. In vitro eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a két-hibrid rendszerrel izolált StubGAL83 fehérje közvetlenül kötődik a StubSNF1 protein kinázhoz.

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

Megállapítottuk, hogy a StubSNF1 kináz regulátor doménje hasonló erősséggel kapcsolódik a StubGAL83 fehérjéhez, mint a teljes StubSNF1 kináz, míg a StubSNF1 katalitikus doménjét (KD) tartalmazó konstrukcióval nem kaptunk interakcióra utaló β-galaktozidáz aktivitást.

Megvizsgáltuk, hogy a StubGAL83 és a ΔStubGAL83 képes-e együttműködni élesztő SNF4 (ySNF4) fehérjével a két-hibrid rendszerben. Mivel a StubGAL83 fehérje hatékonyan képes együttműködni az élesztő SNF4-gyel 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.

A StubGAL83 és a StubSNF1 expresszióját Northern hibridizációval vizsgáltuk a *S. tuberosum* különböző szerveiben. A StubSNF1 a burgonya virágában viszonylag erősen, a többi vizsgált szervében Northern hibridizációval alig kimutatható mértékben expresszál, hasonló alacsony szinten expresszált a gumófejlődés korai stádiumát reprezentáló *in vitro* sztóló és gumó RNS mintákban.

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.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Munkánk során burgonya indukált sztóló cDNS bankból izoláltuk a StubSNF1-nek nevezett cDNS-t. A StubSNF1 jelentős homológiát mutat az SNF1/AMPK géncsalád tagjaihoz. A két-hibrid rendszerben a StubSNF1 fehérjét csaliként használtuk fel és a StubGAL83-nak nevezett cDNS-t izoláltuk. A StubGAL83 cDNS által kódolt fehérje szignifikáns homológiát mutatott az élesztő SIP1/SIP2/GAL83 és az emlős AMPK β1, és β2 fehérjékhez, amikről már bebizonyították, hogy az SNF1/AMPK kináz komplexek összekötő (adaptor) alegységéként funkcionálnak. 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.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

Nemzetközi publikációk

Lakatos L., Klein M., Hofgen R., Bánfalvi Z. (1999): Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts *Plant Journal* 17 (5): 569-574

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 Physiology* 113: 1004

A doktori képzés ideje alatt más témában megjelent közlemények

Molnár A., Lovas A., Bánfalvi Z., **Lakatos L.**, Polgár Z., Horváth S., (2001): Tissue-specific signal(s) activate the promoter of a metallocarboxypeptidase inhibitor gene family in potato tuber and berry *Plant Molecular Biology* 46 (3): 301-311

Lakatos L., Muller F., Dantonel J.C., Strahle U., Tora L. (2001): TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish *Current Biology* 11 (4): 282-287 (megosztott elsőszerzőség)

Dantonel J.C., Quintin S., **Lakatos L.**, Labouesse M., Tora L (2000): TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans Molecular Cell* 6 (3): 715-722

Bánfalvi Z., Molnár A., **Lakatos L.,** Hesse H., Hofgen R. (1999): Differences in sucrose-to-starch metabolism of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens Plant Science* 147 (1): 81-88

Lakatos L., Hutvágner G., Bánfalvi Z. (1998) Potato protein kinase StCPK1: a putative evolutionary link between CDPKs and CRKs *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Stucture and Expression* 1442 (2-3): 101-108

Bánfalvi Z., Molnár A., Kostyál Z., **Lakatos L.**, Molnár G. (1997) Comparative studies on potato tuber development using an in vitro tuber induction system *Acta Biologica Hungarica* 48 (1): 77-86

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): 159-164