

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Az StubSNF1 protein-kináz komplex és a trehalóz-6-foszfát-szintáz hatása a burgonya termőképességére és szárazságtűrésére

Doktori értekezés

Antal Ferenc

Gödöllő 2012 A doktori iskola

megnevezése:	Növénytudományi Doktori Iskola		
vezetője:	Dr. Heszky László egyetemi tanár, az MTA rendes tagja Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet		
tudományterület:	4. Agrártudományok		
tudományága:	4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok		
Témavezető:	Dr. Bánfalvi Zsófia tudományos tanácsadó, az MTA doktora Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont		

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Az SNF1 protein-kináz család és szerepe élesztőben, emlősökben és növényekben	7
2.1.1. Az élesztő SNF1 protein-kináz komplexe	8
2.1.2. AMP-aktivált protein-kinázok	11
2.1.3. A növények SNF1-rokon kinázai	13
2.1.4. SNF1-rokon kinázok burgonyában	16
2.2. A trehalóz, a trehalóz szintézis és kapcsolatuk a növények szárazságtűrő képességéve	118
2.2.1. A trehalóz jelentősége	18
2.2.2. Trehalóz metabolizmus	19
2.2.3. Kísérletek szárazságtűrő növények létrehozására a trehalózszint növelésével	21
2.2.4. A trehalóz-6-foszfát szerepe növényekben	22
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	25
3.1. Enzimek és vegyszerek	25
3.2. Standard molekuláris biológiai technikák	25
3.2.1. Polimeráz láncreakció	25
3.2.2. DNS fragmentumok elválasztása és izolálása	25
3.2.3. DNS fragmentumok klónozása	25
3.2.4. Kompetens sejt készítése	26
3.2.5. Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe	26
3.2.6. Plazmid DNS tisztítása és emésztése endonukleázokkal	27
3.3. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció	27

3.4. Northern hibridizáció	28
3.4.1. RNS izolálás és filter készítés	28
3.4.2. DNS jelölés radioaktív izotóppal	28
3.4.3. Hibridizációs körülmények	28
3.5. Plazmidok és plazmidkonstrukciók	29
3.6. Transzgénikus burgonyanövények előállítása és fenntartása	29
3.7. Enzimaktivitás mérések	30
3.7.1. Nitrát reduktáz aktivitásmérés	30
3.7.2. Kináz aktivitásmérés SAMS szubsztráttal	31
3.8. Élesztő két-hibrid rendszer	32
3.9. Abiotikus stressztűrés vizsgálata	32
3.9.1. Szárazságtűrés vizsgálata levett levél teszttel	32
3.9.2. In vitro sóteszt	32
3.10. Számítógépes programok	32
4. EREDMÉNYEK	34
4.1. Az antiszensz StubSNF1 (aS) burgonyavonalak jellemzése	34
4.2. Az StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyavonalak előállítás	sa és
jellemzése	36
4.2.1. Az aGaS burgonyavonalak előállítása	36
4.2.2. Az aGaS burgonyavonalak gumóhozamának vizsgálata	37
4.2.3. Az aGaS burgonyavonalak transzkripciós vizsgálata	39
4.2.4. Az aGaS burgonyavonalak kináz aktivitásának mérése SAMS peptid szubsztráttal	l40
4.2.5. Az aGaS burgonyavonalak sótűrése	41
4.2.6. Az aG1 és aG5 alapú aGaS burgonyavonalak létrehozása és gumóhozam	ıának
vizsgálata	42

4.3. Az élesztő trehalóz-foszfát-szintáz 1 (TPS1) génjét kifejező burgonyavonalak előállítása
és jellemzése
4.3.1. Az élesztő TPS1 génjét kifejező transzgénikus burgonyavonalak előállítása45
4.3.2. Az élesztő TPS1 génjét kifejező burgonyavonalak jellemzése45
4.3.3. Az aGT burgonyavonalak szárazságtűrésének vizsgálata47
4.4. A TPS1 és az StubSNF1 komplex kapcsolatának vizsgálata élesztő két-hibrid rendszerben
4.5. Az aG, aS, aGaS és aGT burgonyavonalak nitrát-reduktáz aktivitása48
4.6. Új tudományos eredmények51
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK
5.1. Az StubSNF1 antiszensz gátlása a növények károsodásához vezet
5.2. Az StubGAL83 és az StubSNF1 egyidejű gátlásával erőteljesebb növekedésű és nagyobb gumóhozamú burgonyavonalak is létrehozhatók52
5.3. Az StubGAL83 antiszensz gátlása mérsékli a TPS1 expresszió negatív hatásait55
5.4. Az aGT növények fenotípusos javulásának és az aGaS vonalak emelkedett
gumóhozamának hátterében a nitrát-reduktáz aktivitás növekedése áll56
6. ÖSSZEFOGLALÁS
7. SUMMARY
8. MELLÉKLETEK
M1. IRODALOMJEGYZÉK62
M2. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK81
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

abszcizinsav			
antiszensz GAL83 burgonyavonal			
antiszensz GAL83, antiszensz StubSNF1 burgonyavonal			
ADP-glükóz-pirofoszforiláz			
antiszensz GAL83, TPS1 kifejező burgonyavonal			
AMP-aktivált protein-kinázok			
antiszensz StubSNF1 burgonyavonal			
association with SNF1 complex domain – a GAL83 SNF4 kötő doménje			
antiszensz StubSNF1, TPS1 kifejező burgonyavonal			
cauliflower mosaic virus 35S – karfiol mozaik vírus 35S			
galactose metabolism 83 – az élesztő SNF1 komplex β alegysége			
kinase-interacting sequence domain – a GAL83 SNF1 kötő doménje			
β-galaktozidázt kódoló gén			
oktopin-szintáz			
protein-kináz A			
potato kinase 1			
az SNF1 protein-kinázok általános szubsztrátja (HMR <u>SAMS</u> GLHLVKRR)			
az élesztő SNF1 komplex β alegysége			
az élesztő SNF1 komplex β alegysége			
sucrose non-fermenting 1 protein kinase - szacharózt nem fermentáló protein-			
kináz 1			
sucrose non-fermenting 4 protein – az élesztő SNF1 komplex γ alegysége			
sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1 – SNF1-rokon kinázok			
növényekben			
Solanum tuberosum			
trehalóz-6-foszfát-foszfatáz			
trehalóz-6-foszfát-szintáz			
wild type – vad típus			
az élesztő TPS1 génjét kifejező Désirée burgonyavonal			

1. BEVEZETÉS

A burgonya a burgonyafélék (*Solanaceae*) családjába tartozó, keményítőben gazdag gumójú haszonnövény. Világviszonylatban a megtermelt mennyiséget tekintve a negyedik helyen áll a kukorica, rizs és a búza után, viszont a burgonyát termesztik a legtöbb országban. A burgonya egy lágyszárú cserje, melynek földalatti szárcsomóiból sztólók (tarack) fejlődnek. Ezeknek a képleteknek a csúcsi megvastagodásából jön létre a gumó, ami amellett, hogy fontos tápanyagforrás, vegetatív szaporítóképlet is. A növény eredetét Peru déli-, illetve Bolívia északnyugati részére teszik, ahol már 7-10000 évvel ezelőtt is termeszthették (SPOONER et al., 2005). A hosszú ideje zajló nemesítésnek köszönhetően ma már több ezer fajtával rendelkezünk. Ezek mellett körülbelül 200 vadon élő faj és alfaj ismeretes, melyeket számos esetben használtak/használnak a különféle nemesítési programokban arra, hogy abiotikus és biotikus stresszfaktorokkal szemben ellenállóképességet biztosító géneket juttassanak a nemesített fajtákba.

Minden nemesítői erőfeszítés ellenére azonban a burgonya még ma is az egyik legstresszérzékenyebb kultúrnövényünk. Különösen a szárazság okoz minden évben világszerte komoly termésmennyiség veszteséget (VAN LOON, 1981). Munkacsoportunk ezért kezdte el vizsgálni burgonyában több mint tíz évvel ezelőtt az akkor már élesztőből és emlősökből jól ismert, a stresszválaszok és a szénhidrát anyagcsere központi szabályozó fehérjéjét, az SNF1 (sucrose non-fermenting 1) protein-kinázt. Az SNF1 és a vele rokon SnRK1 (SNF1-related kinase 1) család tagjai többnyire három alegységből álló komplex formájában látják el feladatukat. Az SNF1 kináz mint katalitikus alegység, az aktivátor alegység, valamint az összekötő alegység képezte összetett fehérje alkot egy funkcionális egységet. Éhezés vagy stressz hatására az enzimkomplex foszforiláció által aktiválódik és számtalan transzkripciós és poszttranszlációs változást indukál (COELLO et al., 2011). Burgonyában két eltérő funkcióval bíró SnRK1 ismert: az StubSNF1 és a PKIN1. Az StubSNF1 katalitikus alegység mellett sikerült azonosítani a komplex összekötő alegységét is, az StubGAL83-at, egyedül az aktivátor alegység ismeretlen még előttünk. Az StubSNF1 kináz komplex jellemzése részben már megtörtént (LAKATOS et al., 1999; LOVAS et al., 2003a; LOVAS et al., 2003b; SÓS-HEGEDŰS et al., 2005), melynek során többek között bizonyítást nyert, hogy az StubGAL83 alegység gátlása gvökér- és gumófejlődési rendellenességekhez vezet. Az SNF1 kinázok kiemelt jelentősége miatt az StubSNF1 kináz komplex funkciójának vizsgálatát tovább folytattuk és az alábbi célt tűztük ki magunk elé:

1. Az StubSNF1 komplex funkcionális analízisének folytatása olyan növények vizsgálatával, melyekben az StubSNF1 kináz működése gátolt, illetve olyan növények létrehozásával, melyekben az StubSNF1 kináz és az StubGAL83 alegység egyaránt gátlás alatt áll.

válasz molekuláris А szárazságstresszre adott hátterét világszerte számos laboratóriumban tanulmányozzák és keresik azokat a megoldásokat, amelyekkel a növények szárazságtoleranciáját javítani lehet. Ennek egyik lehetséges módjaként a tudomány egy különleges sajátságokkal rendelkező diszacharidnak, a trehalóznak a növényekben történő termeltetését ismeri el (ASHRAF, 2010). Szárazságstressz hatására a trehalóz számos alacsonyabb rendű élőlényben nagy mennyiségben szintetizálódik és a vízmolekulák helyébe lépve stabilizálja a biológiai struktúrákat. A trehalóz bioszintéziséért felelős anyagcsereút megtalálható magasabb rendű növényekben is. A trehalóz termelés molekuláris biológiai eszközökkel elért fokozása számtalan esetben eredményezett szárazságtűrő növényeket több növényfaj esetében is. Ezek a növények azonban legtöbbször törpe fenotípusúak voltak és csak elenyésző mennyiségben tartalmaztak trehalózt, ami arra utal, hogy a szárazságtűrés javulása nem a trehalóz ozmoprotektáns funkciójának köszönhető (FERNANDEZ et al., 2010).

Ismert volt, hogy a glükóz-6-foszfát a trehalóz bioszintézis egyik kiinduló molekulája. Ugyanakkor a glükóz-6-foszfát az SNF1 kinázok aktivitásának gátlószere is (TOROSER et al., 2000). Munkánk kezdetén úgy gondoltuk, hogy a trehalóz termelés fokozása módosíthatja a növényi sejtek glükóz-6-foszfát koncentrációját, ami hatással lehet a SnRK1 komplexek aktivitására és ezen keresztül a burgonyanövénynek a trehalóz termeltetés fokozására adott válaszára. Elméletünknek a gyakorlatban történő vizsgálatára, illetve a trehalóz bioszintézis és az StubSNF1 kináz komplex működése közötti feltételezett kapcsolat hátterének megismerésére a következő célt tűztük ki magunk elé:

2. Az élesztő eredetű trehalóz-6-foszfát-szintáz (TPS1) gén működése és az StubSNF1 kináz közötti kapcsolat megismerése olyan TPS1 gént kifejező burgonyavonalak vizsgálatával, melyekben vagy az StubSNF1 kinázt, vagy pedig az StubGAL83 alegységet gátoltuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az SNF1 protein-kináz család és szerepe élesztőben, emlősökben és növényekben

Az élőlények számára elengedhetetlen a szén- és energiaforrások folyamatos bevitele és felügyelete. Ilyen felügyeletet látnak el az élesztőben az SNF1 (sucrose non-fermenting 1) kinázok, az emlősökben ortológjaik, az AMP-aktivált kinázok (AMPK), valamint a növényekben az SNF1-rokon kinázok (SnRK). Az SNF1 kinázok evolúciósan konzervált heterotrimer szerin/treonin kinázok, melyek metabolikus szenzorokként funkcionálnak minden eukariótában, az egysejtű gombáktól az állatokon át a növényekig. Fontos szerepet játszanak a tápanyagforrások elérhetőségének-, a környezeti stressz szignáloknak-, valamint a szervezet energiaigényeinek összehangolásában és a sejtfolyamatoknak a pillanatnyi állapotokhoz való igazításában. Ezek a fehérjék éhezés- illetve energiahiány esetén aktiválódnak és az energiaigényes életfolyamatok korlátozásával, valamint az energiatermelés elősegítésével lehetővé teszik az élőlények számára a nehéz időszakok túlélését. Emellett az élőlények normális növekedésének illetve fejlődésének szabályozásában is elengedhetetlen szerepet játszanak.

Az AMPK/SNF1/SNRK1 kinázok három alegységes komplexben működnek. A komplex α alegységét élesztőben az SNF1 gén kódolja, amiről egy 72 kDa méretű fehérje (CELENZA és CARLSON, 1986) íródik át. Ez a fehérje – ami a kináz komplex katalitikus alegységét képezi – 46%-os egyezést mutat aminosav szinten az állatokban található AMPK-, valamint a növényekben előforduló SNRK1 fehérjék α alegységével. A katalitikus alegység funkcionálisan két részre osztható: a katalitikus doménre és a regulátor doménre. A kináz aktivátor alegységét az SNF4 gén kódolja (CELENZA és CARLSON, 1989), ami megfelel az AMPK/SNRK1 kinázok γ alegységének. Az említett két alegységen felül a komplex részét képezi a β -, vagy más néven regulátor alegység is. Élesztőben ez három eltérő fehérje is lehet: SIP1, SIP2 és GAL83. A regulátor alegység szerepe a komplex összetartása, sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása és a kináz komplex szubsztrát-specifitásának megszabása (YANG et al., 1994). A β alegységek két funkcionális domént tartalmaznak: az ASC domént (association with SNF1) complex domain) és a KIS domént (kinase-interacting sequence domain). Ezeknek a doméneknek a segítségével a regulátor alegység képes a komplex másik két alegységével kapcsolódni és így összetartani az enzimkomplexet (YANG et al., 1994; JIANG és CARLSON, 1997).

7

2.1.1. Az élesztő SNF1 protein-kináz komplexe

Az SNF1 protein-kinázt először a sütőélesztőből (*Saccharomyces cerevisiae*) izolálták. Az SNF1 (sucrose non-fermenting - szacharózt nem fermentáló) nevet azért kapta, mert a mutáns élesztő, amiből izolálták, képtelen volt bekapcsolni a szacharóz bontó enzimet, az invertázt kódoló *SUC2* gént glükóz éhezés során (CARLSON et al., 1981).

Élesztőben az SNF1 elsődleges funkciója a glükózhiányhoz való alkalmazkodás, melynek révén lehetővé válik a sejtek számára az olyan alternatív szénforrások hasznosítása, mint amilyen a szacharóz és az etanol (CELENZA és CARLSON, 1984; 1986). Emellett az SNF1 fontos szerepet játszik az éhezés következtében intenzívvé váló tartalék szénhidrát szintézisben, valamint a különböző makromolekulák és organellumok autofágián keresztül történő újrahasznosításában (WANG et al., 2001). De létfontosságú a meiózis, a sporuláció (HONIGBERG és LEE, 1998), a szálas növekedés, a biofilm képzés (KUCHIN et al., 2002), valamint az öregedés szabályozásában is (ASHRAFI et al., 2000; LORENZ et al., 2009). Mindezeken felül az SNF1 részt vesz számos stresszhatásra adott válaszban is, mint például a sóstresszre-, az oxidatív stresszhatásra-, valamint a lúgos pH-ra adott válaszokban (HONG és CARLSON, 2007).

Az SNF1 kináz foszforilálódik és ezáltal aktiválódik a glükóz éhezés hatására, valamint a fentebb említett egyéb stresszhatások bekövetkezésekor is. Három protein-kináz vesz részt az SNF1 foszforilálásában: a Sak1, az Elm1 és a Tos3. Ezek a Thr210 pozícióban foszforilálják a kinázt (HONG et al., 2003; NATH et al., 2003; SUTHERLAND et al., 2003). A Sak1 (SNF1activating kinase) korábban Pak1 néven volt ismert, de átnevezték, hogy ne legyen összekeverhető egy másik (p21-activated kinase family) fehérje családdal. A három említett kináz felépítésében nagyon hasonló és funkciójában jelentős átfedést mutat. Ahhoz, hogy az SNF1 kináz aktiválhatóságát teljességgel megszűntessük, mindhárom aktiváló kinázt ki kell iktatni. A Sak1 kináz tűnik a fő aktivátornak, de a Tos3 jelenléte önmagában is elég ahhoz, hogy az élesztő jól nőjön nemcsak glükózon, hanem más szénforráson is. A Sak1 stabilan és tartósan kapcsolódik az SNF1 kinázhoz, míg a Tos3 és az Elm1 csak átmenetileg lép kölcsönhatásba az aktiválandó fehérjével (ELBING et al., 2006). Az SNF1 és a Sak1 stabil kapcsolatát nem a glükózszint szabályozza. A legtöbb Sak1 fehérje a sejtekben összekapcsolódik az SNF1 fehérjékkel, azonban ez is csak az elérhető SNF1 molekulák egy kis részét érinti. A Sak1 kinázok a glükózon növesztett sejtek esetében a citoplazmában helyezkednek el, míg glükóz éhezés hatására egy részük áthelyeződik a vakuoláris membránokba (HEDBACKER et al.,

2004). A Tos3 kináz mindkét körülmény mellett a citoplazmában van (KIM et al., 2005). Az Elm1 fehérje a sarjadzó élesztő "nyakán" helyezkedik el az anya és a leánysejt határán. Ez összhangban van az SNF1 kináztól függetlenül a sejtciklusban és a sejtmorfológiában játszott szerepével (RUBENSTEIN et al., 2006).

Az SNF1 katalitikus aktivitását az 1. típusú Reg1-Glc7 fehérje foszfatáz gátolja. A Glc7 katalitikus alegységét a Reg1 fehérje irányítja az SNF1-hez (TU et al., 1995). A Reg1 fehérje citoplazmatikus elhelyezkedésű mind a glükózon nevelt-, mind pedig a glükózt nélkülöző sejtekben (DOMBECK et al., 1999). A Reg1 fehérje az SNF1 kináz által foszforilálódik és aktiválódik glükóz éhezés hatására, illetve a Glc7 fehérje által defoszforilálódva inaktiválódik glükóz jelenlétében (SANZ et al., 2000).

Az SNF1 kináz szabályozása a komplex sejten belüli helyzetének szintjén is megnyilvánul (1. ábra). Az enzimkomplex β alegységei (SIP1, SIP2, GAL83) felelősek a komplex sejten belüli lokalizációjának meghatározásáért. Magas glükóz koncentráció esetén mindhárom β alegység a citoplazmában van. Glükózhiány esetén a regulátor alegységek egyedi sejten belüli helyzetet vesznek fel és ennek megfelelően irányítják a SNF1 kinázt is (VINCENT et al., 2001).

Az SNF4 fehérje megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is, függetlenül a glükózellátottságtól. A SIP2 alegység a citoplazmában marad, míg a GAL83 alegység a sejtmagba helyeződik át. Normál glükóz-ellátottság mellett a SIP1 a citoplazmában található, a vakuoláris membránba történő áthelyeződését a protein-kináz A (PKA) gátolja. Glükóz éhezés esetén ez a gátlás oldódik és a SIP1 fehérje áthelyeződik a vakuólumok membránjába.

A sóstressz nem befolyásolja az SNF1 és a GAL83 alegység citoplazmatikus helyzetét, azonban alkalikus pH hatására az említett két fehérje áthelyeződik a sejtmagba (HONG és CARLSON, 2007).



1. ábra. Az SNF1 kináz komplex sejten belüli elhelyezkedése (HEDBACKER és CARLSON, 2008 alapján). SNF1: a kináz komplex katalitikus alegysége, SNF4: a kináz komplex aktivátor alegysége, Sip1/Sip2/Gal83: a kináz komplex regulátor alegységei, PKA: protein-kináz A, P: foszforilált SNF1. Glükózhiány esetén a regulátor alegységek egyedi sejten belüli helyzetet vesznek fel és a nyilakkal jelzett módon irányítják a SNF1 kinázt is.

Az SNF1 számos gén átíródását szabályozza. Ezek a gének szerepet játszanak az alternatív szénforrások glükoneogenezisben, hasznosításában, а а légzésben, а transzportfolyamatokban és a meiózisban. Glükóz hiány hatására több mint 400 gén kifejeződését befolyásolja az SNF1, ideértve a glükózszint által leginkább befolyásolt 40 génből 29-et (YOUNG et al., 2003). Az SNF1 több glükóz által gátolt gén átíródását szabályozza a Mig1 transzkripciós gátló fehérje foszforilálásával (TREITEL et al., 1998; OSTLING és RONNE, 1998). A Mig1 foszforilációja a transzkripciós faktor aktivitását negatívan befolyásolja, így segítve elő az általa gátolt gének átíródását. In vitro körülmények között kimutatták, hogy az SNF1 kináz kölcsönhatásba lép az RNS polimeráz II enzimmel, majd ezt követően glükóz-szabályozta módon átírást indukál (KUCHIN et al., 2000). Az SNF1 képes a kromatinállomány módosítására is. Az INO1 promoter esetében bizonyították, hogy az SNF1

foszforilálja a H3 hiszton fehérjét a Ser10 pozícióban, ami közvetve a gén átírásához vezet (LO et al., 2001).

Az SNF1 részt vesz a zsírsav anyagcsere és a tartalék szénhidrát képzés enzimeinek szabályozásában is. Foszforilálja és inaktiválja az acetil-koenzim-A-karboxilázt és ezáltal gátolja a zsírsav bioszintézist glükózhiány esetén (WOODS et al., 1994). Az élesztő egyik fontos tartalék szénhidrátjának - a glikogénnek - a képzésében is elengedhetetlen az SNF1 közreműködése. Hiányában a sejtek nem akkumulálják ezt a tartalék szénforrást (THOMPSON-JAEGER et al., 1991).

Az SNF1 a szén mellett a foszfát-, a szulfát- és a nitrogénhiányra adott sejtszintű válaszokban is szerepet játszik (THOMPSON-JAEGER et al., 1991).

2.1.2. AMP-aktivált protein-kinázok

Az élesztő SNF1 kinázának állatokban megtalálható ortológ változatai az AMP-aktivált protein-kinázok (AMPK). Számos sejtfolyamat igényel energiabefektetést, s ez az energia leginkább az ATP molekulák hidrolíziséből származik. Az elhasznált energia pótlására számos anyagcserefolyamat szolgál, köztük például a glükóz oxidációja. Az ATP molekulák szintézise túlnyomórészt a mitokondriumok belső membránjánál történik. A mitokondrium kialakulása hatalmas ugrást jelentett az eukarióták evolúciójában, mert megjelenésével létrejött egy olyan sejtszervecske, amely el tudta látni elegendő energiával az energiaigényes életfolyamatokat. Emellett szükség volt egy olyan rendszer létrejöttére is, ami érzékelte a citoplazma "energiaállapotát" és ehhez igazította a mitokondriális funkciót. Ezt a feladatot az AMP-aktiválta protein-kináz kapta.

Emlősökben hét gén vesz részt az AMPK-k felépítésében: két α alegységet (α 1 és α 2), két β alegységet (β 1 és β 2), valamint három γ alegységet (γ 1, γ 2 és γ 3) kódoló gén. A hét gén alapján szabad kombinációval 12 heterotrimer enzim jöhet létre, de a tapasztalat az, hogy a lehetséges 12 heterotrimer enzimkombinációból bizonyos kombinációk nagyobb gyakorisággal fordulnak elő. Az alegységek a kötőpartnerek hiányában általában instabilak, ami valamelyik alegység túlzott megnyilvánulása esetén a kötőpartnerekért kialakuló versengéshez vezethet az alegységek között (MU et al., 2001; HAWLEY et al., 2010).

Az α alegységek egy szerin/treonin-kináz domént tartalmaznak az N terminális oldalukon, ami akkor lesz jelentősen aktív, ha egy másik kináz foszforilálja (HAWLEY et al., 1996). A legtöbb emlős sejtben a kináz foszforilációját egy három alegységes enzimkomplex

végzi, amelynek tagjai az LKB1 kináz, valamint a STRAD és a MO25 alegységek (HAWLEY et al., 2003). AMP kötödése esetén az AMPK konformációs változáson megy át, ami három egymástól független mechanizmussal segíti elő az AMPK aktiválódását: [1] a Thr 172-es pozícióban történő foszforiláció elősegítésével (HAWLEY et al., 1995), [2] a Thr 172-es pozíció defoszforilációjának gátlásával (DAVIES et al., 1995), [3] a Thr 172-es pozícióban foszforilált AMPK allosztérikus aktiválásával (CORTON et al., 1995). Érdekes módon az egyes és a kettes mechanizmus mind ADP-, mind pedig AMP kötődésével kiváltható, ugyanakkor a hármas mechanizmus csak AMP közreműködésével indítható el (OAKHILL et al., 2011; XIAO et al., 2011).

Az AMPK-t olyan metabolikus stresszhatások aktiválják, amelyek vagy gátolják valamilyen módon az ATP szintézisét (pl glükóz éhezés, hipoxia, isémia), vagy pedig felgyorsítják az ATP fogyasztását (pl., izomösszehúzódás) (HARDIE, 2007). A sejtszintű energiaháztartás szabályozásában betöltött szerepe mellett az AMPK-k működését olyan hormonok és citokininek is befolyásolják, amelyek szerepelnek az energiaháztartás egész szervezet szintjén megnyilvánuló szabályozásában (KAHN et al., 2005).

Az AMP-aktivált protein-kinázok képesek ATP-t generáló katabolikus anyagcsereutakat bekapcsolni és leállítani az ATP-t fogyasztó anabolikus folyamatokat. Az aktivált folyamatokra példaként megemlíthető a glükóz felvétel (HOLMES et al., 1999), a glikolízis (MARSIN et al., 2000), a zsírsavfelvétel (BONEN et al., 2007) és a zsírsavak lebontása (MERRIL et al., 1997).

Az AMPK-k gátolják az olyan energiaigényes folyamatokat, mint a zsírsavszintézis, a triglicerid- és foszfolipid szintézis, a glikogén szintézis és a glükoneogenezis (HARDIE, 2007).

Az AMPK részt vesz a mitokondrium biogenezis szabályozásában is. A PCG-1α nevű transzkripciós faktort a folyamat fő szabályozójaként tartják számon. Elősegíti az új mitokondriumok létrejöttét és a sejtmagban kódolt mitokondriális gének kifejeződését. Az AMPK két helyen is foszforilálja a PCG-1α-t, amivel lehetővé teszi a faktor aktiválódását (JAGER et al., 2007).

Az autofágia segítségével a sejtek képesek újrahasznosítani sejtalkotóikat. Ez a folyamat különösen nagy jelentőséggel bír akkor, ha a sejt éhezik. Ez, az élesztőgombákban jól körülírt jelenség, csak a közelmúltban kezdett részleteiben ismertté válni az állati szervezetek esetében is. Ma már tudjuk, hogy az AMP-aktivált protein-kinázok szerepet játszanak a mitokondriumok újrahasznosításának (mitofágia) folyamatában is (WANG és LEVINE, 2010).

2.1.3. A növények SNF1-rokon kinázai

A növényi SNF1-rokon kináz (SnRK) család három alcsaládra oszlik, melyek az SnRK1, az SnRK2 és az SnRK3 nevet kapták. *Arabidopsis* modellnövényben a három alcsalád 38 tagot számlál (2. ábra).



2. ábra. Arabidopsis thaliana-ban az SNF1-rokon kináz (SnRK) család 38 tagot számlál, melyek három alcsaládba sorolhatók (SnRK1, SnRK2 és SnRK3) (HALFORD és HEY, 2009 alapján). SNF1: élesztő SNF1 kináz, AMPK: AMP-aktivált kináz állatokban, NIK1: Nim1-szerű kináz: mitózist indukáló kináz élesztőben.

Az első *SnRK1* gént rozsból izolálták az alapján, hogy képes volt az élesztő *snf1* mutációját komplementálni (ALDERSON et al., 1991). Ez a fehérje 47%-os egyezést mutatott aminosav szinten az élesztő SNF1-gyel és az állati AMPK α -val. A később *Arabidopsis*-ból izolált és az *SNF4/AMPK* γ génekkel homológ *AtSNF4* csupán részlegesen képes komplementálni az élesztő *snf4* mutációját (KLEINOW et al., 2000). A *SIP1/SIP2/GAL83/AMPK* β génekkel homológ növényi géneket izoláltak többek között *Arabidopsis*-ból (*AKIN* β 1 és *AKIN* β 2) valamint burgonyából is (BOULY et al., 1999; LAKATOS et al., 1999). Érdekes módon *Arabidopsis*-ban és kukoricában találtak olyan fehérjéket, melyek az AKIN $\beta\gamma$ nevet kapták azért, mert tartalmaznak egy KIS domént az aminoterminálisukon (ennek segítségével kapcsolódik az enzimkomplex β alegysége a katalitikus α alegységhez) és egy SNF4-szerű domént a karboxiterminálisukon (LUMBRERAS et al., 2001). Ennek az "alegységhalmozásnak" a háttere ismeretlen. Ugyanez a tanulmány rávilágított arra is, hogy ezeknél a géneknél alternatív mRNS érési lehetőségek is találhatók, ami arra enged következtetni, hogy változó körülmények hatására különféle alegység összetételű SnRK1-ek jelenhetnek meg, és ez tovább finomíthatja az SnRK1-ek szabályozását.

Az SnRK1 kinázok számos enzim aktivitását szabályozzák közvetlenül, illetve közvetve a génkifejeződés módosításával (3. ábra). BAENA-GONZÁLEZ et al. (2007) *Arabidopsis* modellnövényben az SnRK1 gátlás hatását vizsgálták microarray kísérletekkel, amiből kiderült, hogy több mint 1000 gén kifejeződése megváltozik, ha csökken az SnRK1 aktivitása, ami arra utal, hogy közvetve vagy közvetlenül legalább 1000 gén átírását szabályozzák a SNF1-rokon kinázok.

A nagyszámú gén kifejeződésének szabályzása mellett az SnRK1 kinázok számos enzim működését is befolyásolják (3. ábra). Az SnRK1 foszforilálja és inaktiválja a HMG-CoA (3hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A) reduktázt (HMGR) (BALL et al., 1994; 1995), ami a HMG-CoA molekulát redukálja mevalonsavvá. Ez az enzimreakció az izoprenoid bioszintézis egyik kulcslépése. A HMGR mellett az SnRK1 közvetlenül foszforilálja és inaktiválja a szacharózfoszfát-szintázt, a nitrát-reduktázt (SUDGEN et al., 1999), a trehalóz-foszfát-szintázt (HARTHILL et al., 2006) és a foszfofrukto-2-kináz/fruktóz-2,6-biszfoszfatázt (F2KP) is (KULMA et al., 2004).



3. ábra. Enzimek, melyek aktivitását az SnRK1 módosítja foszforiláció útján vagy redox aktiválással, illetve azok a folyamatok, melyekben ezek a fehérjék fontos szerepet töltenek be. (HALFORD és HEY, 2009 alapján). F2KP: foszfofrukto-2-kináz/fruktóz-2,6-biszfoszfatáz, HMG-CoA: 3hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A.

A növényi SnRK-k - hasonlóan az élesztőben és állatokban található ortológ kinázokhoz - foszforiláció útján aktiválódnak. *Arabidopsis*-ban két olyan kináz található, melyek az SnRK1 aktiválásáért felelősek: az SnAK1 (SnRK1-activating kinase 1) és az SnAK2 (HEY et al., 2007). Ezek az enzimek amellett, hogy az SnRK1 molekulákat egy jól meghatározott pozícióban foszforilálják, képesek az élesztő *elm1/sak1/tos3* mutációját is komplementálni.

Az SnRK1 kinázok a vírus-gazdanövény kapcsolat létrejöttében is szerepet játszanak. A geminivírusok által kódolt AL2 és L2 fehérjék képesek az SnRK1-hez kötődni és gátolni annak aktivitását. Az *SnRK1* gén kifejeződésének antiszensz gátlása növeli a növények érzékenységét a vírusfertőzéssel szemben, míg ugyanezen fehérje túltermeltetése az ellenkező hatást eredményezi (HAO et al., 2003). Ez arra utal, hogy az SnRK1-ek fontos szerepet játszanak a növények vírusokkal szembeni védekezésében, amit a vírusok a kinázok inaktiválásával próbálnak meg gyengíteni.

Az SnRK1 kinázok mellett a növények tartalmaznak még két SnRK alcsaládot, az SnRK2-t és az SnRK3-at. Ezek a fehérjék aminosav szinten 42-45%-os egyezést mutatnak az SnRK1/SNF1/AMPK fehérjékkel a katalitikus domén tekintetében. *Arabidopsis*-ban az SnRK2 és SnRK3 alcsaládoknak jóval több tagjuk van, mint az SnRK1 alcsaládnak. Bár funkciójuk nem ismert olyan részletességgel, mint az SnRK1-eké, minden jel arra mutat, hogy döntő szerepük van az abszcizinsav (ABA) által közvetített, illetve egyéb stresszválaszokban.

Rizsben az SnRK2 alcsalád 10 tagot számlál, melyek mindegyike indukálódik ozmotikus stressz hatására, illetve három közülük ABA által is szabályozott (KOBAYASI et al., 2004). Egy *Arabidopsis* eredetű SnRK2 fehérje túltermeltetése génexpressziós változások elősegítésével fokozza a növény szárazságtűrését (UMEZAWA et al., 2004). Az SnRK2.2, 2.3 és 2.6 génekben mutáns *Arabidopsis* növények csaknem teljesen érzéketlenné válnak az ABA kezeléssel szemben (FUJI és ZHU, 2009).

Az SnRK3 alcsalád tagjai vélhetőleg kálcium-függő aktivitást mutatnak, mivel képesek kölcsönhatásba lépni kalcineurin B-szerű (CBL - calcineurin B-like) fehérjékkel (GUO et al., 2002). Az *Arabidopsis* ionháztartását az "Salt Overly Sensitive" (SOS) jelátviteli útvonal vezérli, melynek három fő komponense van: az SOS1, egy Na⁺/H⁺ antiporter, mely a citoplazma felesleges Na⁺ tartalmát távolítja el; az SOS2, egy SnRK3-típusú protein-kináz és az SOS3, egy Ca²⁺ szenzor fehérje (MAHAJAN et al., 2008). Az SOS3 fehérje képes érzékelni a sóstressz hatására emelkedő Ca²⁺ koncentrációt, aminek következtében az SOS2 kinázhoz kapcsolódik és aktiválja azt. Az aktív SOS2/SOS3 komplex foszforilálja és aktiválja az SOS1 Na⁺/H⁺ antiportert (ISHITANI et al., 2000; GUO et al., 2001), ami eltávolítja a citoplazma felesleges Na⁺ tartalmát.

2.1.4. SNF1-rokon kinázok burgonyában

Burgonyából mindezidáig két olyan gén cDNS-ét izolálták, melyek az *SnRK1* alcsaládba tartoznak: a *PKIN1*-et (MAN et al., 1997) és az *StubSNF1*-et (LAKATOS et al., 1997). MAN et al. (1997) megállapították, hogy a *PKIN1* kifejeződése a levélben gyenge, míg a sztólóban és a gumóban jóval erősebb. PURCELL et al. (1998) antiszensz technikával gátolták a *PKIN1* kifejeződését gumóban, illetve a növények hajtásában és leveleiben. A szacharóz-szintáz enzim aktivitása 64%-kal csökkent azoknak a növényeknek a gumóiban, amelyekben a *PKIN1* gén kifejeződését gumóspecifikusan gátolták. A hajtásspecifikus gátlást hordozó transzgénikus burgonyavonalak esetében a szacharóz-szintáz gén kifejeződésének szacharóz általi indukálhatósága jelentősen sérült.

LAKATOS et al. (1999) élesztő két-hibrid rendszerben a burgonya StubSNF1-et csalifehérjeként használva azonosítottak egy cDNS-t, ami a szekvenciája alapján ortológnak bizonyult az élesztő SIP1/SIP2/GAL83-, valamint az állati AMPKß génekkel. Az újonnan megismert fehérje - ami az StubGAL83 nevet kapta - élesztő két-hibrid rendszerben képes volt kölcsönhatásba lépni a burgonya StubSNF1 fehérjéjével. Az StubGAL83 magas expressziót mutatott a legtöbb szervben, de a kifejeződés mértéke szervenként eltérő volt. Ezzel szemben az StubSNF1, a virág kivételével, alacsony kifejeződési mintázatot adott. Az a tény, hogy az StubGAL83 élesztő két-hibrid rendszerben képes volt kölcsönhatásba lépni az élesztő SNF1 fehérjéjével arra utal, hogy a burgonya SnRK1-ei is komplexben működnek, hasonlóan az élesztőben és az állatokban találtakkal. Az StubGAL83 behatóbb vizsgálatát LOVAS et al. (2003a) végezték el. Kimutatták, hogy a fehérjét kódoló gén kifejeződése éjszaka intenzívebb, mint nappal, ráadásul a még nem kifejlődött és nem asszimiláló levelekben jóval erősebb az átíródás, mint az asszimiláló levelekben. Az StubGAL83 szerepének további tanulmányozása céljából antiszensz technikával StubGAL83-gátolt növényeket hoztak létre. A folyamatos gátlás eredményeként a transzgénikus növényekben a génről átíródó hírvivő RNS szintje 90-95%-kal csökkent. A létrehozott növényvonalak gyökérfejlődése késedelmet szenvedett, illetve később sem fejlődött ki olyan mértékben, mint amilyen a kontroll növényekben volt tapasztalható. Emellett ezek a növények sokkal rosszabbul reagáltak a sóstresszre, mint a vad típus. Az StubGAL83 a gyökérfejlődésben betöltött szerepe mellett a gumófejlődésre is hatással van. Az antiszensz gátlás alá vont növényekben az átlagos gumóméret lecsökkent és a gumószám megnőtt.

LOVAS et al. (2003b) élesztőben megnyilvánítva is vizsgálták a PKIN1 és az StubSNF1 tulajdonságait. Kimutatták, hogy a PKIN1 fehérje, ellentétben az StubSNF1-gyel, képtelen kölcsönhatásba lépni az StubGAL83-mal. Az StubSNF1 ellensúlyozza az élesztő $\Delta snf1$ mutációját, vagyis képes átvenni az élesztő SNF1 funkcióját. Ugyanerre a feladatra a PKIN1 nem képes. Érdekes módon az StubSNF1 fehérje arra is alkalmas, hogy részlegesen ellensúlyozza az élesztő $\Delta snf4$, illetve $\Delta sip1/\Delta sip2/\Delta gal83$ mutációit is. A PKIN1 molekula ebben az esetben sem mutat hasonlóságot az StubSNF1 fehérjével és alkalmatlan az élesztő $\Delta snf4$, illetve $\Delta sip1/\Delta sip2/\Delta gal83$ mutációi arra is fény derült, hogy a két burgonya SnRK1 funkciója eltérő. A kísérletsorozatból arra is fény derült, hogy az StubGAL83 nemcsak a PKIN1-gyel nem tud kölcsönhatásba lépni, hanem az élesztő

SNF1 molekulájával sem. Ennek a kölcsönhatásnak a hiányában az StubGAL83 nem képes ellensúlyozni az élesztő $\Delta sip 1/\Delta sip 2/\Delta gal 83$ mutációit sem.

A PKIN1 gumóspecifikus túltermeltetése jelentős élettani változásokkal jár a transzgénikus növényekben (MCKIBBIN et al., 2006). Az így létrehozott növényvonalak gumóinak SnRK1 aktivitása 55-167%-kal haladta meg a vad típus ugyanezen értékét. A módosítás következtében a gumók glükózszintje 44-83%-kal csökkent és ezzel párhuzamosan a keményítőtartalom 23-30%-kal nőtt. A keményítő létrehozásában fontos szerepet betöltő szacharóz-szintáz és ADP-glükóz pirofoszforiláz enzimek mRNS-szintje és aktivitása ugyancsak megemelkedett a transzgénikus növényekben. Ezek az eredmények a burgonya SnRK1 kinázainak szénhidrát anyagcserében játszott központi szerepét erősítik. BECZNER et al. (2010) nyomán tudjuk, hogy az StubSNF1 és a PKIN1 élesztő két-hibrid rendszerben kölcsönhatásba lép a burgonya citoplazmatikus piruvát-kinázával. A piruvát-kináz deléciós származékainak felhasználásával pontosan behatárolták a kölcsönhatásért felelős régiót is. Antiszensz technikával létrehoztak olyan növényeket, melyekben vagy az StubSNF1, vagy pedig a PKIN1 kifejeződését gátolták. A transzgénikus növényekben a piruvát-kináz aktivitását 24 órán át követve megállapították, hogy az StubSNF1 és a PKIN1 csökkent aktivitása egymástól eltérő módon módosítja a piruvát-kináz aktivitásának napi ritmusát, ami szintén a két SnRK1 eltérő szerepére utal burgonyában.

2.2. A trehalóz, a trehalóz szintézis és kapcsolatuk a növények szárazságtűrő képességével

2.2.1. A trehalóz jelentősége

A trehalóz egy nem redukáló diszacharid, ami két glükóz molekulából épül fel α , α - 1, 1glikozidos kötéssel. A molekuláról először WIGGERS számolt be 1832-ben olyan rozsnövényekkel kapcsolatosan, melyeket az anyarozs nevű fitopatogén gomba fertőzött. Ezt követően még leírták számos baktériumból, gombából, gerinctelenekből és növényekből is (ELBEIN et al., 2003).

A trehalóz molekula mindkét redukáló vége részt vesz a glikozidos kötés kialakításában, emiatt ellenáll a savas hidrolízisnek még magas hőmérsékleten is (RICHARDS et al., 2002). A trehalóznak két olyan sajátossága is van, ami alkalmassá teszi a membránok és a molekulák stabilizálására: a vízmolekulák trehalóz általi lecserélhetősége és a biológiai üvegképzés képessége. A trehalóz hidrogénhidakat képez a membránokkal és makromolekulákkal kiszáradáskor illetve hidegstressz bekövetkezésekor, és így lép a vízmolekulák helyébe (CROWE, 2007). Az üvegképzés során a trehalóz nem csak kikristályosodik, hanem egy üvegszerű állapotba kerülve szilárdul meg teljes kiszáradás során (RICHARDS et al., 2002). Ez a tulajdonsága egyedülálló a szénhidrátok között. Úgy vélik, hogy a trehalóz ebben az üvegszerű állapotban képes megvédeni a különféle biomolekulákat a denaturációtól, így őrizve meg azok biológiai aktivitását a rehidratálódás utáni időszakra.

Évekig tartotta magát az a tévhit, miszerint a trehalóz csak az olyan kiszáradástűrő növényekben fordul elő, mint a *Myrothamnus flabellifolius* és a *Selaginella lepidophylla*, amiben a trehalóz 10 mg/g friss súly koncentrációban is felhalmozódhat (PAUL et al., 2008). Később azonban *Arabidopsis*-ban is ki tudták mutatni úgy, hogy a trehalóz lebontásáért felelős trehaláz enzimet gátolták (MÜLLER et al., 2001). Ezt követően igazolták a trehalóz jelenlétét rizsben (GARG et al., 2002) és dohányban is (KARIM et al., 2007). Fontos megemlíteni, hogy ezekben a növényekben mindössze átlag 10 μ g/g friss tömeg volt a trehalóz koncentrációja, ami nagyságrendekkel kisebb a kiszáradástűrő növényeknél mért értékeknél.

2.2.2. Trehalóz metabolizmus

A trehalóz bioszintézisére öt anyagcsereút szolgál baktériumokban, gombákban és algákban, de ezekből csak egyféle útvonal létezik növényekben (4. ábra).

Magasabbrendű növényekben a trehalóz bioszintézis első lépését a trehalóz-6-foszfátszintáz (TPS) enzim katalizálja. UDP-glükóz és glükóz-6-foszfát összekapcsolásával létrejön a trehalóz-6-foszfát. A következő lépésben a trehalóz-6-foszfát-foszfátáz (TPP) enzim a molekuláról lehasítja a foszfátcsoportot, így keletkezik a trehalóz. A trehalóz lebontásáért a trehaláz enzim a felelős, ami a diszacharidból két glükóz molekulát hoz létre. Növényekben először *Arabidopsis*-ból írtak le TPS (*AtTPS1*) és TPP (*AtTPPA* és *AtTPPB*) géneket (BLÁZQUEZ et al., 1998; VOGEL et al., 1998). Ezek a gének funkcionálisan aktív fehérjéket kódolnak, amelyek képesek az élesztő *tps*-, illetve *tpp* mutációit komplementálni. A további vizsgálatok során kiderült, hogy *Arabidopsis*-ban összesen 11 *TPS* és 10 *TPP* gén található, amelyek közül azonban sok nem mutat biológiai aktivitást. (LEYMAN et al., 2001). Más növényekben is találtak olyan géneket, melyek a trehalóz bioszintézisében vesznek részt. Például rizsben legkevesebb kilenc *TPS* és ugyancsak kilenc *TPP* gén található (AVONCE et al., 2006). Ezzel szemben érdekes módon *Arabidopsis*-ban és szójában (*Glycine max*) csupán egy-egy trehaláz gén felelős a trehalóz lebontásáért (FRISON et al., 2007).



4. ábra. A trehalóz bioszintézise és lebontása (FERNANDEZ et al., 2010 alapján). TPS: trehalóz-6-foszfát-szintáz, TPP: trehalóz-6-foszfát-foszfatáz, TreH: trehaláz, TreT: trehalóz-glikozilátvivő-szintáz, TreY: maltooligozil-trehalóz-szintáz, TreZ: maltooligozil-trehalóz trehalohidroláz, TS: trehalóz-szintáz, TreP: trehalóz-foszforiláz, UDP: uridin-difoszfát. Növényekben csak a kékkel kiemelt szintézis út található meg, míg baktériumokban, gombákban és algákban mind az ötféle szintézis út előfordul.

2.2.3. Kísérletek szárazságtűrő növények létrehozására a trehalózszint növelésével

Rizsben, trehalóz kezelés hatására kimutatták, hogy jelentősen csökken a sóstressz okozta károsodások mértéke. Ezekben a növényekben csökkent a Na⁺ ionok felhalmozódása, valamint a levéllemezek klorofill-tartalmának csökkenése. A trehalóz ellensúlyozta a sóstressz növekedésgátló hatását, illetve elősegítette a gyökérzet integritásának megőrzését (GARCIA et al., 1997). Folyadékkultúrában növesztett *Arabidopsis* növényekben a tápközegbe juttatott trehalóz hatására a növényi sejtek trehalózszintje átmenetileg megemelkedik. Ez a jelenség elősegíti olyan gének átíródását, valamint olyan fehérjék termelődését, melyek fontos szerepet játszanak a növényi stresszválaszokban, valamint különféle méregtelenítő folyamatokban (BAE et al., 2005a,b).

Számos kutatócsoport próbálkozott korábban olyan transzgénikus növényeket létrehozni, melyekben a trehalóz bioszintézis módosításával kívánták elérni a szárazságtűrő fenotípust. Az első ilyen növényt HOLMSTRÖM et al. (1996) állították elő agrobaktérium-közvetítette transzformációval. A Saccharomyces cerevisiae TPS1 génjét fejeztették ki dohány növényben, a zöld részekben folyamatos expressziót biztosító Rubisco promóter segítségével. A transzgénikus növényekben megemelkedett a trehalóz koncentrációja a vad típushoz képest és szárazságtűrővé váltak. Nem várt mellékhatásként ezek a növények 30-50%-kal kisebbek voltak, mint a kontroll növények. AVONCE et al. (2004) hasonló elvek által vezérelve fejeztették ki folyamatosan az Arabidopsis AtTPS1 génjét Arabidopsis-ban. Az előállított növények szárazságtűrő fenotípussal rendelkeztek, de később virágoztak, mint a kontroll növények. Dohány növények transzformálásával sikerült előállítani olyan szárazságtűrő vonalakat, melyekben az élesztő TPS1 génjét stressz-indukálható- és kloroplasztisz specifikus promóterrel juttatták kifejezésre (KARIM et al., 2007). Az élesztő TPS1 génjét kifejező transzgénikus paradicsom növények ellenállóbbak a só-, a szárazság- és az oxidatív stresszekkel szemben (CORTINA et al., 2005). A trehalóz bioszintézisért felelős Escherichia coli gének (OtsA, OtsB) kifejezésre juttatása rizsben olyan növényeket eredményezett, melyek ellenállóbbak lettek a só- és a hidegstresszel szemben. A génmódosított vonalakban háromszorosa volt a trehalóz koncentrációja a kontroll növényekben mért értékhez képest. A transzgénikus növények fontos jellemzője továbbá a szénhidrátok fokozott felhalmozása és a megnövekedett fotoszintetikus aktivitás is (GARG et al., 2002).

STILLER et al. (2008) a *Saccharomyces cerevisiae TPS1* génjét juttatták be burgonyába markermentes transzformáció alkalmazásával. A transzgén kifejeződését a *StDS2* szárazságindukálható promoterrel szabályozták. Az általuk jellemzett génmódosított - és

szárazságtűrő - burgonyavonalak fenotípusos rendellenességeket mutattak a vad típusú növényekkel összehasonlítva és gumóhozamuk is jóval kisebb volt a kontroll növények hozamához képest. Optimális körülmények között a *TPS1* gént kifejező vonalakat csökkent sztómaszám és alacsony CO_2 kötés jellemezte. A munka folytatásaként széleskörű transzkripciós és metabolikus vizsgálatoknak vetettük alá ezeket a növényvonalakat normál és szárazságstresszelt körülmények között. Megállapítottuk, hogy a transzgén jelenléte jelentős transzkripciós és metabolit változásokat eredményez nemcsak szárazságstressz idején, de optimális körülmények között is (KONDRÁK et al., 2011; 2012).

A legtöbb létrehozott transzgénikus növény esetében sikerült a szárazságtűrést javítani, azonban néhány kivételtől eltekintve a kísérleti növények különböző fejlődésbeli rendellenességeket mutattak. A transzgénikus növényekben a trehalóz koncentrációja nem közelítette meg a kiszáradástűrő növényekben mért értékeket, így nyilvánvalóvá vált az a tény, hogy ezekben a növényekben a trehalóz nem szerepelhet a hagyományos értelemben vett ozmoprotektánsként. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy más változások eredményezik a génmódosított növények abiotikus stressztűrését.

2.2.4. A trehalóz-6-foszfát szerepe növényekben

Jelenlegi tudásunk alapján kijelenthető, hogy a trehalóz-6-foszfát (T6P) növényekben jelmolekulaként működik és rengeteg anyagcsere- és fejlődési folyamat szabályozásában vesz részt, illetve központi szerepet játszik a szénhidrát anyagcsere szabályozásában is (PAUL et al., 2008). A T6P valószínűleg képes belépni egy máig ismeretlen mechanizmus által a kloroplasztba, ahol keményítő szintézist indukál az AGP-áz enzim redox aktiválásával (5. ábra). Ugyanitt a T6P átalakulhat trehalózzá, amiről kimutatták, hogy gátolja a keményítő lebontását.



5. ábra. A trehalóz bioszintézise és az anyagcserében betöltött feltételezett szerepe (PONNU et al., 2011 alapján). UDPG: uridin-difoszfát glükóz, T6P: trehalóz-6-foszfát, TRE1: trehaláz1, AGP-áz: ADP-glükózpirofoszforiláz, TPP*: feltételezetten a kloroplasztban működő trehalózfoszfát-foszfatáz, ABI4: abszcizinsav érzéketlen faktor 4, bZIP11: bázikus leucin cipzár transzkripciós faktor 11, ABA: abszcizinsav

A T6P képes az *Arabidopsis* SnRK1 kinázainak gátlására (ZHANG et al., 2009). Ugyanezt a gátló képességet kimutatták más növényfajokban is, többek között búzában (MARTÍNEZ-BARAJAS et al., 2011) és burgonyában (DEBAST et al., 2011). A magas szacharóz koncentráció hatására megnő a T6P mennyisége is, ami gátolja a növényi SnRK1eket. Csökkenő szacharóz koncentráció mellett a T6P mennyisége is kevesebb lesz, aminek következtében az SnRK1 molekulák felszabadulnak a gátlás alól és a fotoszintetikus folyamatok aktiválásával ellensúlyozzák a szénhidrátok hiányát (DELATTE et al., 2011). Az *Arabidopsis* bZIP11 (basic region leucine zipper transcription factor 11) transzkripciós faktor túltermeltetése *Arabidopsis*-ban csökkenti a növények T6P szintjét és érzéketlenné teszi a növényt a tápközegbe adagolt trehalózzal szemben is. Ezzel párhuzamosan megfigyelték a növényi SnRK1 aktivitásának visszaesését is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a bZIP11 transzkripciós faktor a szénhidrát metabolizmus meghatározó szabályozója és tagja annak a szabályozó hálózatnak, mely magába foglalja az SnRK1-eket és a T6P-ot is (DELATTE et al., 2011) Az *E. coli TPS (OtsA)* génjét a gumóban kifejező burgonyavonalakban a T6P szint emelkedésével párhuzamosan csökkent keményítőtartalmat, kevesebb ATP-t és intenzívebb légzést figyeltek meg. A génmódosítás hatására a gumók csírázása késett. Ezzel szemben az *E. coli TPP (OtsB)* génjét gumóspecifikusan kifejező növényekben a T6P szint lecsökkent és megnőtt az oldható szénhidrátok, valamint az ATP mennyisége. A keményítőtartalom nem változott, azonban a csökkent T6P szintet mutató vonalak korábban csíráztak, mint a vad típus (DEBAST et al., 2011).

A T6P szerepet játszik a normális növényfejlődésben is. *Arabidopsis tps1* mutánsoknál az embriófejlődés zavart szenved (EASTMOND et al., 2002). Ha az ilyen növényekben a *tps1* mutációt csak az embriófejlődést követően engedjük érvényesülni, akkor abnormális vegetatív növekedésű és virágfejlődésű növényeket kapunk (VAN DIJKEN et al., 2004). Ugyancsak *tps1* mutáns *Arabidopsis* növényekből mutatták ki számos ABA jelátvitelben szereplő gén megemelkedett kifejeződését is (GÓMEZ et al., 2006).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Enzimek és vegyszerek

A munkánkhoz felhasznált enzimeket a Fermentas International Inc. gyártotta. Az alkalmazott vegyszerek a Bio-Rad, Duchefa, Fluka, Reanal és Sigma-Aldrich cégek termékei voltak. A radioaktív izotópokat az Izotóp Intézet Kft. szállította.

3.2. Standard molekuláris biológiai technikák

SAMBROOK et al. (1989) útmutatásait követve hajtottuk végre az olyan alapvető molekuláris biológiai technikákon alapuló tisztításokat és vizsgálatokat, mint a nukleinsav gélelektroforézis, plazmidizolálás, restrikciós endonukleázzal történő emésztés, valamint a molekuláris klónozás.

3.2.1. Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakciót (PCR) 50 μl-es térfogatban végeztük, a következő összeállításban: 1×PCR puffer (10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200-200 μM dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 1.4-2.0 ng primer, 50-100 ng templát DNS, 5 egység Taq-, vagy 2,5 egység Pfu polimeráz. A reakció elején egy tíz percig tartó egyedi 95 °C-os denaturációs lépést alkalmaztunk. Ezt követően harminckilenc ciklust végeztünk a következő módon: 95 °C-os denaturáció 30 másodpercig, 54 °C-os anellálás 30 másodpercig, 72 °C-os extenzió 30-60 másodpercig.

3.2.2. DNS fragmentumok elválasztása és izolálása

A restrikciós emésztés és a PCR során keletkező DNS fragmentumokat 1-1.2%-os agaróz gélben választottuk szét 1xTBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA, pH 8.1-8.3) pufferben és UV fényben tettük láthatóvá, a gélben 1 mg/l koncentrációban jelen lévő etídiumbromid segítségével. A kívánt DNS fragmentumokat az agaróz gélből szikével kivágtuk és a gyártó utasításait követve, QIAEX II Gel Extraction Kit-tel (QIAGEN) izoláltuk.

3.2.3. DNS fragmentumok klónozása

Az izolált, és szükség esetén emésztett DNS fragmentumokat a megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztett plazmid vektorba építettük be. Azokban az esetekben, amikor a kívánt

konstrukció létrehozásához nem állt rendelkezésre megfelelő restrikciós hely, a primerek végére tervezett hasítóhellyel hoztuk létre a megfelelő végszekvenciával rendelkező fragmentumot. Ilyenkor az izolált DNS-hez 200 nM dNTP keveréket és 2.5 U Klenow enzimet adtunk a megfelelő pufferrel és 37°C-on, 30 perc inkubálással a fragmentum végeit feltöltöttük, majd a restrikciós emésztés után ligáltuk a megfelelően emésztett plazmidba. A ligálási reakció 16 órán át zajlott 16°C-on T4 DNS ligáz enzim hozzáadásával.

3.2.4. Kompetens sejt készítése

LB táplemezen növesztett *Escherichia coli* DH5 α baktériumtörzsből 12 kolóniát 120 ml SOB tápfolyadékban (1 dm³ oldatban feloldva 20 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract és 0.5 g NaCl, majd használat előtt kiegészítve 0.6 ml 2M-os MgCl₂ oldattal) leoltottunk és 18°C-on 200 rpm fordulatszámmal rázatva OD₆₀₀=0.3 értékig növesztettük. Ezt követően 10 percig jégre helyeztük a sejtkultúrát, majd 4°C-on 2500 *g*-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd a leülepedett sejteket 20 ml jéghideg TB pufferben (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6.7) szuszpendáltuk. Tíz percig jégen hagytuk a sejtszuszpenziót, majd ismételten centrifugáltuk 4°C-on 2500 *g*-vel 10 percig, amit a felülúszó ismételt eltávolítása követett. Ezután a sejteket 4.65 ml TB pufferben szuszpendáltuk. Hozzáadtunk 0.35 ml dimetil-szulfoxidot és 10 percig jégen pihentettük. Végül 200 µl-enként Eppendorf csövekbe osztottuk szét és a csöveket folyékony nitrogénben fagyasztottuk le. A sejteket felhasználásig (maximum 3 hónap) -70°C-on tároltuk.

3.2.5. Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe

Az *E. coli* sejtek transzformálását INOUE et al. (1990) módszere szerint végeztük. Transzformáció után a sejteket antibiotikum mentes folyékony LB tápoldatban 37°C-on rázattuk, majd a szelekciós markernek megfelelő antibiotikummal kiegészített szilárd táptalajra szélesztettük. Amennyiben a vektor-konstrukció a *lacZ* gén jelenlétén alapuló kék-fehér szelekciót lehetővé tette, a szilárd táptalajra ezt megelőzően 10 µl 1M izopropil-tio- β -Dgalaktozidot (IPTG) és 40 µl 20 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozidot (X-gal) szélesztettünk.

3.2.6. Plazmid DNS tisztítása és emésztése endonukleázokkal

A bakteriális plazmid DNS-t az ún. alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk (SAMBROOK et al., 1989). Az RNS-t 30 µg RNáz-A enzimmel degradáltuk (37°C, 30 perc), majd a DNS-t 1/20-ad térfogat 4 M Na-acetáttal (pH 5.5) és 3 térfogat abszolút etanollal kicsaptuk (-70°C, 20 perc). Ezt követően a kicsapódott DNS molekulákat centrifugáltuk (25 min, 16000 g, 4°C), 75%os etanolban kétszer mostuk, szárítottuk és 20-50 µl desztillált vízben oldottuk vissza. A szekvenálandó plazmidok esetében a tisztítást BIO-RAD Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint.

A plazmid DNS-eket 10-50 µl reakció-térfogatban, a gyártó által javasolt pufferben és hőmérsékleten 60-90 percig emésztettük a megfelelő restrikciós enzimmel.

3.3. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

A növények leveléből STIEKEMA et al. (1988) nyomán RNS-t izoláltunk. Az RNS izolátumokból 45 µg-nyi mennyiséget DNáz kezelésnek vetettünk alá (RNase Free DNase Set, QIAGEN), majd az így kapott mintákat tovább tisztítottuk (RNeasy Minelute Cleanup Kit, QIAGEN). Ezt követően 2 µg tisztított RNS-ből kiindulva cDNS-t szintetizáltunk "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" alkalmazásával (APPLIED BIOSYSTEMS). A valós idejű polimeráz láncreakciót (qRT-PCR) CORBETT Rotor Gene 3000 készüléken végeztük oly módon, hogy minden minta esetén három párhuzamos reakciót készítettünk. A reakciók összetétele a következő volt: 10 µl Power Sybr Green Mix (APPLIED BIOSYSTEMS), 3 µl forward primer (2.5 pm/µl), 3 µl reverse primer (2.5 pm/µl), 2 µl 10X higított cDNS, 2 µl H₂O). A delta-delta Ct módszeren alapuló relatív kvantifikáció kivitelezéséhez a kísérletben a burgonya endogén *vacuolar ATPase1* génjét használtuk referenciagénként. A reakciót a "Rotor-Gene 6.0.27" program segítségével értékeltük ki (CORBETT LIFE SCIENCE).

1. táblázat

Α	kísér	letekber	1 használt	qPCR	primerek	
---	-------	----------	------------	------	----------	--

Primerek	Szekvencia
galrtfw	5'-tcc gca gag tcc acat cg ttc ag-3'
galrtrv	5'-atc ctc aca ttc att gcc cca cat t-3'
snfrdqpcr_fw	5'-ttt gcc acg tta ttt ggc cgt acc-3'
snfrdqpcr_rev	5'-atg gcg att gtc cag gag cag ata-3'
vac fw	5'-gtg tca cct gtt cca taa ttg tg-3'
vac rev	5'-cat aat cac gga ggc caa aac-3'

3.4. Northern hibridizáció

3.4.1. RNS izolálás és filter készítés

A növényi össz-RNS-t ez esetben is STIEKEMA et al. (1988) nyomán izoláltuk 500 mg növényi szövetből kiindulva. Az RNS mintákból LOGEMANN és mtsai (1987) módszerével 20-20 µg-ot denaturáltunk és formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elválasztottunk. A gélt 30 percig 20xSSC-ben (3 M NaCl, 3.3 mM tri-Na-citrát, pH 7.0) mostuk, majd 20xSSC-vel blottoltuk Hybond N membránra. Az RNS-eket UV cross-linker készülékkel és 1 óra hosszan tartó, 80°C-os inkubálással rögzítettük a membránra AMASINO (1986) nyomán.

3.4.2. DNS jelölés radioaktív izotóppal

A northern hibridizációkhoz $[\alpha^{-32}P]dCTP$ -vel jelölt, tisztított DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést "random priming" módszerrel (FEINBERG et al., 1983) végeztük. A DNS fragmentumokat a be nem épült izotóptól Sephadex G-25 oszlopon választottuk el, majd denaturálás után a hibridizációs pufferhez adtuk.

3.4.3. Hibridizációs körülmények

A jelölt próbát a CHURCH et al. (1984) által leírt pufferben (0.5 M Na₂HPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA, 1% BSA, pH 7.2), forgó hibridizációs tégelyben, 65°C-on, 20 órán át inkubáltuk a membránnal. Utána a nem specifikusan megtapadt próbát 65°C-on kétszer 15 percig 0.1% SDS, 2xSSC oldatban, illetve egyszer 15 percig 0.1% SDS, 0.2xSSC oldatban történő mosással távolítottuk el. Röntgen filmet tettünk a filterre és -70°C-on exponáltuk a jel erősségétől függően 1-7 napig. Végül a membránra exponálódott képet előhívtuk, szkennerrel digitalizáltuk, és az Adobe System Adobe Photoshop programjával formáztuk és feliratoztuk.

3.5. Plazmidok és plazmidkonstrukciók

A Saccharomyces cerevisiae TPS1 génjét expresszáló növényvonalak létrehozásához a gén 1507 bázispár hosszúságú cDNS szekvenciáját (GenBank: X68496.1) *KpnI-XbaI* fragmentumként építettük be a higromicin szelekciós markert kódoló pBINAR bináris vektor (GenBank: Z37515.1) *KpnI-XbaI* helyére, a CaMV 35S, konstitutív expressziót biztosító promóter, valamint az ocs expressziós terminátor közé.

A burgonya endogén *StubSNF1* génjének (GenBank: U83797.4) specifikus gátlásához az *StubSNF1* gén regulátor doménjének 779 bázispárt lefedő cDNS szakaszát fordított orientációban építettük be a higromicin szelekciós markert hordozó pBINAR bináris vektorba a CaMV 35S promóter és az *ocs* terminátor közé.

Az élesztő két-hibrid rendszerben elvégzett kísérletekhez a *Saccharomyces cerevisiae TPS1* génjének 1507 bázispár hosszúságú szekvenciáját építettük be a pAD-GAL4 (Genbank: U36450.1) és pBD-GAL4 (GenBank: U36451.1) vektorokba *SmaI-PstI* hasítóhelyekre.

A teljes hosszúságú *StubSNF1* és a teljes hosszúságú *StubGAL83* cDNS pAD-GAL4 és pBD-GAL4 vektorokba épített klónjai LAKATOS LÓRÁNT korábbi munkájából (1999) származtak. Ezeket a konstrukciókat szintén az élesztő két-hibrid kísérletekben használtuk fel.

3.6. Transzgénikus burgonyanövények előállítása és fenntartása

A növénytranszformációhoz használt, pGV2260-as plazmidot hordozó C58C1-es *Agrobacterium tumefaciens* törzset (DEBLAERE et al., 1985) YEB táptalajban növesztettük Vervliet és mtsai (1975) alapján. A módosított bináris vektorokat konjugációval (DITTA et al., 1980) juttattuk be *A. tumefaciens*-be.

Munkánkhoz *Solanum tuberosum* cv. Désirée burgonyanövényeket használtunk. A steril növényi alapanyagot *in vitro* körülmények között neveltük 24°C-on, hosszúnappalos (16 h fény, 8 h sötét) megvilágítással, 5000 lux fényerő mellett, 2% szacharózt tartalmazó RM, illetve MS táptalajon (MURASHIGE és SKOOG, 1962).

A transzgénikus Désirée növényeket levéltranszformációval állítottuk elő DIETZE et al. (1995) nyomán. A létrehozott növényekben a transzgén jelenlétének igazolásához és a transzgén-specifikus kis RNS frakció jelenlétének kimutatásához *in vitro* növények leveleit használtuk.

Az RM táptalajon kémcsőben nevelt 6 hetes *in vitro* burgonyanövényeket "A260 típusú" steril földet tartalmazó cserepekbe ültettük és üvegházi körülmények között vizsgáltuk.

Az StubSNF1-gátolt (aS) és StubGAL83-gátolt (aG) vonalak agrobaktérium-közvetítette transzformációval lettek létrehozva a pCP60 bináris vektor (Genbank: U09365.1) segítségével, ami kanamicin rezisztenciát kölcsönöz a transzgénikus növényeknek (LOVAS et al., 2003a; SÓS-HEGEDŰS et al., 2005). Ezeknek a növényvonalaknak az újra transzformálásával állítottuk elő kettős antiszensz vonalainkat (aGaS), valamint az élesztő *TPS1* génjét kifejező növényeinket is.

3.7. Enzimaktivitás mérések

3.7.1. Nitrát reduktáz aktivitásmérés

Az általunk alkalmazott módszer HAGEMAN és HUCKLESBY (1971), illetve HARRIS et al. (2000) munkáján alapul. A kísérlethez használt növényeket hat hétig tartó, in vitro nevelés után üvegházi környezetbe ültettük és négy-nyolc hétig neveltük. A kivonat készítés során végig jégen dolgoztunk. Mintánként 3-4 növény asszimiláló leveleit (a növénycsúcstól lefelé számítva a harmadik és a hetedik levélszint közötti levelek) dörzsmozsárban eldörzsöltük oly módon, hogy a növényanyaghoz grammonként 6 ml kivonó puffert (1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM cisztein-HCl, 25 mM kálium-foszfát puffer pH 8.8, 1 mM dithiothreitol, 5 µM leupeptin) adtunk. A homogenizátumot centrifugáltuk (15 perc, 16000 g, 4°C), majd a felülúszót használtuk az enzimaktivitás meghatározásához. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 0.5 ml 100 mM kálium-foszfát puffer pH 7.5, 0.1 ml 100 mM KNO3 oldat, 0.1 ml 5 mM NADH oldat, 0.2 ml H₂O, 0.1 ml extraktum. A reakció 25°C-on 10 percig zajlott. Ezt követően a mintákat tartalmazó csövekbe 0.5 ml szulfanilamid (1% w/v 1.5 N HCl oldatban), illetve 0.5 ml N-(1-naftil)etiléndiamin-hidroklorid reagenst (0.02% w/v H2O-ban) adtunk. A reagensek hozzáadása után fél órát vártunk, mialatt az oldat végleges színösszetétele kialakult. Végül 540 nm-en fotometráltuk mintáinkat és a reakciók során termelődött nitrit mennyiségét 0.0-0.6 mg/l koncentrációjú NaNO₂ oldatok felhasználásával készült kalibrálósor segítségével határoztuk meg. Eredményeinket a kiindulási kivonatok BRADFORD (1976) módszerével meghatározott fehérjekoncentráció értékeihez normalizálva véglegesítettük.

3.7.2. Kináz aktivitásmérés SAMS szubsztráttal

A burgonya SnRK1 enzimeinek részleges tisztítását MAN et al. (1997) szerint végeztük, 1 g in vitro növényekről gyűjtött levelekből. A kivonatok fehérjetartalmát BRADFORD (1976) módszerével határoztuk meg. A SAMS peptid (HMRSAMSGLHLVKRR) az SNF1 kinázok általános szubsztrátja. Az in vitro transzgénikus növények SnRK1 aktivitására a SAMS peptid foszforilációjának mértékéből következtettünk. A SAMS foszforilációs aktivitást egy általánosan használt foszforizotópos módszerrel mértük (MAN et al., 1997; DAVIES et al., 1989). 1g 5-6 hetes in vitro növényekről származó levélanyagot folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 1 ml "E" (extrakciós) puffert (0.25 M mannitol, 50 mM HEPES, 50 mM nátrium-fluorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM benzamidin, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSF (fenil-metilszulfonil-fluorid) pH 8.2) adtunk hozzá. Miután a minta felolvadt, 200 µl 5%-os Triton X 100 oldattal egészítettük ki. Az így kapott elegyet 13000 rpm fordulatszámmal, 4°C-on 30 percig centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd ammónium-szulfátot adagoltunk hozzá úgy, hogy a kivonatban a koncentrációja 85 mg/ml legyen (15%-os kicsapás). Az ammónium-szulfát teljes feloldása után jégen 20 percig lassú rázatással kevertük a kivonatot, majd újra centrifugáltuk (13000 rpm, 30 perc, 4°C). A felülúszót egy tiszta Eppendorf csőbe mértük és 40% ammónium-szulfáttal a fehérjéket kicsaptuk az előző kicsapáshoz hasonló módon. Újabb centrifugálást (13000 rpm, 30 perc, 4°C) követően az üledéket 0.5 ml "F" pufferben (50 mM Tris, 50 mM nátrium-fluorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM benzamidin, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF 0.02% Brij 35, pH 8.2) óvatosan fel-le pipettázva oldottuk fel. Az elegyet "F" pufferrel átmosott NAP5 oszlopon (Illustra NAP™ Columns, GE Healthcare) tisztítottuk tovább. Az így kapott fehérje kivonatot használtuk az enzimreakcióhoz. Minden mintából 6 lépcsős felező hígításban mértünk össze reakcióelegyeket, melyek összetétele a következő volt: 5 µl extraktum, 5 µl H₂O, 5 µl "A" puffer (50 mM HEPES, 50 mM nátriumfluorid, 1 mM DTT, pH7.0), 5 μl γ-ATP oldat (0.5 μl 10 mM ATP, 0.5 μl 250 mM MgCl₂, 3.83 μ l H₂O, 0.17 μl [γ³²P]ATP), 5 μl 200 μM SAMS. A reakcióelegyeket 30 percig inkubáltuk 30°C-on, majd 15 µl-t Whatman papírra (P81 ion exchange chromatography paper) pipettáztunk belőlük. A papírt négyszer 5 percig mostuk foszforsavas vízzel (12.5 ml/l 85%-os foszforsav), majd 2 percig acetonba mártottuk. Ezt követően 95 °C-ra hevített thermo-block-on (Block-Therm heating module type: 656, MTA KUTESZ) megszárítottuk és celofánba csomagoltuk. 30 percre Storage Phosphor Screen-t (GE Healthcare) helveztünk rá, majd az ezen kialakuló képet

Storm 840 szkennerrel (Molecular Dynamics) digitalizáltuk és Imagequant 5.2 program (Molecular Dynamics) segítségével értékeltük.

3.8. Élesző két-hibrid rendszer

Az élesztő transzformálását GIETZ és WOODS (1994) nyomán, a Clontech Yeast Protocols Handbook (PT3024-1, Published 14 March 2001) útmutatásai alapján végeztük. A létrehozott élesztővonalak β-galaktozidáz aktivitását JIANG és CARLSON (1996) által használt úgynevezett "filter-lift" vizsgálattal elemeztük, szintén a fent említett módszertani leírás alapján.

3.9. Abiotikus stressztűrés vizsgálata

3.9.1. Szárazságtűrés vizsgálata levett levél teszttel

A vizsgálathoz három hónapos, üvegházi körülmények között nevelt burgonyanövényeket használtunk. A hajtáscsúcstól lefelé számolva, a negyediktől a hetedik levélszintig elhelyezkedő asszimiláló leveleket gyűjtöttünk, melyek súlyát rögtön megmértük. Ezt követően 32 órán keresztül, 8 órás időközökkel mértük a levelek súlyát. Az idő függvényében lejátszódott súlyvesztést diagramon ábrázoltuk.

3.9.2. In vitro sóteszt

Burgonyavonalaink sótűrésének vizsgálatához *in vitro* körülmények között fenntartott növényeink szárszegmentjeit normál RM táptalaj mellett olyan RM táptalajra helyeztük, mely az eredeti recepthez képest 50 mM koncentrációban nátrium-kloridot is tartalmazott. Ezt követően 20 napon keresztül regisztráltuk a gyökeret eresztett szárszegmentek számát. A kísérlet végén százalékosan ábrázoltuk az egyes növényvonalak gyökeret eresztett szárszegmentjeinek számát az idő függvényében. A kísérletben növényvonalanként 36 szegmentet vizsgáltunk. Két független kísérlet eredményeit összesítettük. A tesztben a só jelenlétére érzékenyebben reagáló vonalak kisebb gyökerezési hajlandóságot mutattak.

3.10. Számítógépes programok

A DNS szekvenciák elemzéséhez a Lasergene-DNASTAR programcsomagot használtuk. A konvencionális polimeráz láncreakciók oligonukleotidjainak tervezéséhez a Lasergene-DNASTAR- és a Softpedia-PRIMER PREMIER 5.0 programokat, továbbá a kvantitatív polimeráz láncreakciók esetében az INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES weboldalán található programot használtuk (<u>http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/</u>).

A digitális illetve digitalizált képeket az Adobe Photoshop 6.0 programmal (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) szerkesztettük. A kináz aktivitásmérés során kapott eredmény vizualizálásában és kvantifikálásában a MOLECULAR DYNAMICS IQ SOLUTIONS V. 5.2 programcsomag volt segítségünkre.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az antiszensz StubSNF1 (aS) burgonyavonalak jellemzése

Az StubSNF1-gátolt vonalak részleges jellemzése már korábban megtörtént (SÓS-HEGEDŰS et al., 2005; BECZNER et al., 2010). Az utóbbi munkában bizonyítottuk, hogy a két burgonya SnRK1 (StubSNF1 és PKIN1) képes kapcsolódni a burgonya citoszolikus piruvátkinázával. Az StubSNF1-gátolt és a PKIN1-gátolt vonalakban a piruvát-kináz napi aktivitása eltérő módon változott, ami a két burgonya SnRK1 eltérő szerepére utal. Ezt követően a vonalak fenotípusát és gumóhozamát vizsgáltuk in vitro és üvegházi körülmények között. Három vonal részletes jellemzését hajtottuk végre, melyek az aS2, aS5 és aS6 kódot kapták. Megállapítottuk, hogy az aS vonalak gyökérfejlődése a vad típushoz képest a legtöbb esetben elmarad. Ez a tulajdonságuk már in vitro körülmények között is egyértelműen megmutatkozik és üvegházi környezetben is megmarad, ami a vad típushoz képest legtöbbször kisebb növényeket eredményez (6. ábra). További fontos jellemvonása ezeknek a növényeknek az, hogy gumóik mind színükben, mind pedig formájukban eltérnek a vad típusú gumóktól. Az aS növények gumói sötétebbek és sárgásabbak, mint a vad típusú növényeké, valamint jellemző a gumókra a "babásodás", ami felületi kitüremkedések, azaz másodlagos gumók kialakulását jelenti. Az aS növények gumóhozama legtöbbször elmarad a vad típusétól, mint ahogy azt a három független üvegházi gumóhozam-kísérlet eredményét bemutató 7. ábra is tükrözi. A bemutatott eredmények alapján kijelenthető, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása fenotípusos előnyt nem kölcsönöz a növények számára, csupán jól detektálható hátrányokkal jár.


6. ábra. Antiszensz StubSNF1 vonalak fenotípusa. (A) *in vitro* gyökérfejlődés, (B) üvegházi növények, (C) üvegházi növények gumói (aS: antiszensz StubSNF1, aG: antiszensz StubGAL83, WT: vad típus)



7. ábra. Antiszensz StubSNF1 növények gumóhozama. (Az egy csillag 95%-os-, a két csillag pedig 99%-os valószínűségű, jelentős eltérést jelez a vad típushoz képest *t*-teszt alapján)

4.2. Az StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyavonalak előállítása és jellemzése

4.2.1. Az aGaS burgonyavonalak előállítása

A kettős antiszensz növényvonalak előállításához a már korábban előállított aG6 növényvonalat felültranszformáltuk az *StubSNF1* gén regulátor doménjének 779 bázispárt lefedő cDNS szakaszát fordított orientációban hordozó pBINAR bináris vektorral, folyamatos kifejeződést biztosítő CaMV 35S promóter szabályzása alatt. Az agrobaktérium-közvetítette növénytranszformáció eredményeként kialakult, kalluszokból fejlődött új hajtásokat izoláltuk és a két, antiszensz konstrukciót hordozó vektor által a növényi szövetekbe juttatott antibiotikum rezisztenciát felhasználva szelektáltuk növényeinket kanamicint és higromcint tartalmazó táptalajon. Így összesen 84 kettős antibiotikum rezisztenciát hordozó növényvonalat sikerült előállítanunk. A növényvonalak egy része törpe fenotípusú volt és közülük több, sárgás levelekkel rendelkezett. Harminchat növényvonal azonban a vad típushoz hasonló jegyeket mutatott, de voltak közöttük olyanok is, melyek gyorsabban, erőteljesebben fejlődtek a kontroll növényekkel összevetve. Ez az *in vitro* kultúrában tapasztalt fenotípus később, üvegházi körülmények között is megmaradt.

4.2.2. Az aGaS burgonyavonalak gumóhozamának vizsgálata

Az *in vitro* kultúrában felszaporított növények közül 36, a vad típushoz hasonló fenotípussal rendelkező növényvonalat üvegházi környezetbe ültettünk ki, majd cserepeikből négy hónap után felszedtük a gumókat és vonalanként értékeltük a gumóhozamokat (8. ábra). Az ábrán "aGaS1" és "aGaS4" kódjelű növényvonalak törpe fenotípussal rendelkeztek, leveleik sárgásak voltak *in vitro* környezetben. Ezt a két vonalat, mint negatív kontrollt, használtuk a gumóhozam tesztelési kísérletekben.



8. ábra. aG6 alapú aGaS növényvonalak gumóhozama a vad típushoz képest százalékban kifejezve

Az aGaS burgonyanövények gumóinak vizsgálata során megállapítottuk, hogy ezeknek a növényvonalaknak a gumói sem színben-, sem pedig formában nem térnek el a vad típusú gumóktól, azoktól elkülöníteni ránézésre nem lehet, szemben az aS növényvonalak esetében tapasztaltakkal. Húsz vonal a vad típusnál, illetve az aG6 kontrollnál kevesebbet, 16 vonal viszont azoknál többet termett. Öt vonal termésátlaga a kontrollokénál 1.5-szer vagy még annál is nagyobb volt. Ezek közül két vonalat, az aGaS6-ot és aGaS7-et, vizsgáltuk meg részletesebben - az aGaS1 és aGaS4 vonalakkal, mint negatív kontrollokkal együtt - a további kísérletekben (9. ábra).



9. ábra. aGaS kettős antiszensz növények üvegházi körülmények között kontroll növényekkel.

Az aGaS1 és aGaS4 növények üvegházi környezetben sokszor életképtelenek, csak ritkán érik meg a gumókötéshez szükséges kort. Az aGaS6 és aGaS7 jelű vonalak ezzel szemben a vad típushoz képest erőteljesebb növekedésűek és nagyobb gumóhozamúak. Az előkísérletek során vonalanként csupán 4-5 cserépbe ültettünk ki növényeket korlátozott üvegházi lehetőségeink miatt. Az előzetes gumóhozamteszt eredményének megerősítésére új kísérleteket állítottunk be, melyekben már a kiválasztott két vonalat - az aGaS6-ot és aGaS7-et - legalább 15-20 cserépben vizsgáltuk. Ezt a kísérletet háromszor megismételtük. Így már pontos eredményeket kaptunk az aGaS6 és aGaS7 vonalak termőképességéről (10. ábra).



10. ábra. Az aGaS6 és aGaS7 növényvonalak gumóhozama három független kísérlet alapján. (Az egy csillag 95%-os, a két csillag pedig 99%-os valószínűségű, jelentős eltérést jelez a vad típushoz képest *t*-teszt alapján.)

4.2.3. Az aGaS burgonyavonalak transzkripciós vizsgálata

A kettős antiszensz növények létrehozásához felhasznált aG6 vonalban az StubGAL83 antiszensz gátlás alatt áll. Felmerült bennünk a kérdés, hogy ez a gátlás megmaradt-e a kettős antiszensz növényekben is. Ennek kiderítésére kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót (qRT-PCR) végeztünk négy kettős antiszensz vonallal (aGaS1, aGaS4, aGaS6, aGaS7), valamint a vad típusú és az aG6 növényvonallal is (11. ábra).



11. ábra. Az StubGAL83 kifejeződése qRT-PCR vizsgálat alapján. (A két csillag 99%os valószínűségű jelentős eltérést jelez a vad típushoz képest *t*-teszt alapján.)

Méréseink alapján mindegyik aGaS vonalban megmaradt az StubGAL83 gátlása, sőt ez az aGaS4, de főleg az aGaS6 vonalban, még erősödött is. A jelenség magyarázatát nem ismerjük. De mivel irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az antiszensz gátlás a géncsendesítés mechanizmusán keresztül működik (DI SERIO et al., 2001), elképzelhetőnek tartjuk, hogy ezekben a vonalakban a két antiszensz gátlás együttesen már olyan erős volt, hogy ez kihatott az egész géncsendesítési mechanizmusra, ami az StubGAL83 mRNS mennyiségének az aG6-hoz viszonyított csökkenéséhez vezetett.

Az StubSNF1 antiszensz gátlásának igazolására szintén terveztünk qRT-PCR kísérleteket, ezek azonban eredménytelennek bizonyultak. Nem sikerült ugyanis olyan oligonukleotid párt terveznünk, melyekkel a polimeráz láncreakció megfelelően működött volna. Mivel a vizsgálandó célgén transzkriptumának cDNS-éről átírt láncreakciós termék felszaporodása alacsony hatékonysággal történt, így nem vált lehetővé annak korrekt kiértékelése.

A qRT-PCR sikertelenségét követően az StubSNF1 antiszensz gátlásának igazolására northern hibridizációt végeztünk (12. ábra). A kísérlethez felhasznált RNS molekulákat *in vitro* növényekből izoláltuk. A hibridizációs próba az antiszensz konstrukció létrehozásához is felhasznált, az *StubSNF1* regulátor doménjét lefedő szekvenciarész volt. A hibridizáció eredményeként egyedül az aGaS6 vonalnál tapasztaltunk kismértékű csökkenést a transzkriptum mennyiségében.



12. ábra. Antiszensz növényvonalak northern hibridizációs képe StubSNF1 próbával (A). RNS-gélkép hibridizáció előtt (B).

4.2.4. Az aGaS burgonyavonalak kináz aktivitásának mérése SAMS peptid szubsztráttal

Egy enzim antiszensz gátlásának végső bizonyítására kézenfekvő megoldás az adott enzim aktivitásának mérése. Az SNF1-rokon kinázok aktivitásának mérésére elterjedt módszer a

SAMS peptid, mint szubsztrát alkalmazása. Radioaktívan jelölt ATP molekulákat adva a reakcióelegyhez mérhetővé válik az enzimek aktivitása az alapján, hogy mennyi SAMS peptid foszforilálódik a radioaktív foszforral. Kiválasztott növényvonalaink "SAMS aktivitását" a 13. ábra mutatja.





A vad típushoz képest minden vizsgált vonalban jelentős enzimaktivitás csökkenést mértünk. Az StubGAL83-gátolt aG6 vonalhoz képest azonban, csak az aGaS6 vonalban mértünk további számottevő aktivitáscsökkenést, ami összhangban van mind az StubGAL83-, mind pedig az StubSNF1 mRNS mennyiségének alacsony szintjével (11. és 12. ábra).

4.2.5. Az aGaS burgonyavonalak sótűrése

Eukariótákban az SNF1 kinázok fontos szerepet játszanak a különféle stresszhatásokra adott válaszok szabályozásában. Az aGaS növények abiotikus stresszhatásra adott válaszának vizsgálatára *in vitro* sótesztet állítottunk be, melyben azt néztük, hogy 50 mM NaCl jelenlétében hány nap elteltével jelenik meg gyökér a táptalajba szúrt egy nóduszos szárszegmenteken (14. ábra). Az eredmény alapján kijelenthető, hogy a vizsgált kettős antiszensz növényvonalak

abiotikus stressztűrése jelentősen rosszabb a vad típusénál, sőt, még az aG6 vonalénál is, ami pedig szintén sóérzékenyebb, mint a vad típusú kontroll.



14. ábra. Antiszensz növényvonalak *in vitro* sótesztje (az ábrázolt értékek a vegetatív szaporítással létrehozott szárszegmentek gyökerezési hajlandóságát mutatják 50 mM NaCl tartalmú táptalajon a napok függvényében).

4.2.6. Az aG1 és aG5 alapú aGaS burgonyavonalak létrehozása és gumóhozamának vizsgálata

Az aG6 transzgénikus burgonyavonal ismételt transzformálásával tehát sikerült előállítanunk olyan burgonyanövényeket, melyek gumóhozama jelentősen meghaladta a vad típusét. Megvizsgáltuk azt, hogy más antiszensz StubGAL83-gátolt vonalat használva elérhetünk-e hasonló eredményt, vagyis sikerül-e más aG vonal felültranszformálásával olyan kettős antiszensz burgonyavonalakat előállítani, melyek gumóhozama magasabb a kontroll növényekénél. Két, szintén korábban előállított StubGAL83-gátolt burgonyavonalat használtunk a kísérlethez (LOVAS et al., 2003a), az aG1-et és az aG5-öt. Az aG1 vonal transzformálásával 63, az aG5 vonal transzformálásával pedig 41 kettős antiszensz burgonyavonalat állítottunk elő. Az *in vitro* környezetben a vad típushoz aránylag hasonló fenotípussal rendelkező vonalakat felszaporítottuk és üvegházi körülmények között teszteltük a gumóhozamukat (15. és 16. ábra).



15. ábra. aG1 alapú aGaS vonalak gumóhozam tesztje (a zöld a vad típus)



16. ábra. aG5 alapú aGaS vonalak gumóhozam tesztje (a zöld a vad típus)

Az aG1 és aG5 vonalak transzformálásából származó növényvonalak gumóhozam vizsgálata során megállapítottuk, hogy nem csak az aG6 vonal felhasználásával vagyunk képesek emelkedett gumóhozamú növényeket előállítani, hanem más StubGAL83-gátolt vonal esetében is elérhető ez az eredmény üvegházi körülmények között.

4.3. Az élesztő trehalóz-foszfát-szintáz 1 (*TPS1*) génjét kifejező burgonyavonalak előállítása és jellemzése

Az élesztő eredetű trehalóz-6-foszfát-szintáz 1 (TPS1) és az StubSNF1 kináz közötti kapcsolat megismerése céljából olyan *TPS1* gént kifejező növényvonalakat állítottunk elő, melyekben vagy az StubSNF1 kináz, vagy pedig az StubGAL83 alegység állt antiszensz gátlás alatt. Munkánk kezdetén kutatócsoportunk korábbi munkája nyomán rendelkezésre álltak antiszensz StubSNF1 (aS) és antiszensz StubGAL83 (aG) vonalak (LOVAS et al, 2003a; BECZNER et al., 2010). Ezek a transzgénikus növényvonalak kanamicin rezisztenciagént hordoztak, ezért egy másik rezisztenciagént kódoló vektort kerestünk a kettős transzformáns növényvek előállítására.

4.3.1. Az élesztő TPS1 génjét kifejező transzgénikus burgonyavonalak előállítása

Az StubSNF1-gátolt aS6 és az StubGAL83-gátolt aG6 vonalakat felültranszformáltuk az élesztő *TPS1* génjével a higromicin rezisztenciát kódoló pBINAR bináris vektor segítségével. A *TPS1* gén folyamatos kifejeződését a burgonyában a CaMV 35S promóterrel biztosítottuk. A transzformáció kontrolljaként vad típusú Désirée növényekbe (WT) is bejuttattuk a *TPS1* gént. Hat WT-TPS1 (WTT), 25 aS6-TPS1 (aST) és 27 aG6-TPS1 (aGT) növényvonalat izoláltunk. A WTT növényvonalakat higromicint tartalmazó táptalajon, míg az aST és az aGT növényvonalakat kanamicint és higromicint egyaránt tartalmazó táptalajon regeneráltattuk. Az így nyert burgonyavonalakat vegetatívan szaporítottuk *in vitro* körülmények között a további kísérletekhez.

4.3.2. Az élesztő TPS1 génjét kifejező burgonyavonalak jellemzése

Az előállított növényeket vegetatív módon szaporítottuk, fenotípusukat *in vitro* és üvegházi körülmények között vizsgáltuk, illetve a transzgén kifejeződését northern hibridizációval mutattuk ki (17. ábra.).

Az élesztő *TPS1* génjét kifejező WTT növények már *in vitro* körülmények között is jelentős eltérést mutattak a vad típusú Désirée (WT) burgonyanövényekhez képest. Leveleik mérete csökkent, számuk megemelkedett és színük halványzöld, illetve sárgás volt. A növényekre jellemző volt a bokrosodás. Általános fejlettségben elmaradtak a vad típusú kontroll növényektől. Az üvegházi körülmények között tovább nevelt növényeken szintén láthatók voltak fenotípusos eltérések, melyek intenzitása összhangban állt a transzgén kifejeződésének mértékével. A WTT transzgénikus növények fejlettsége elmaradt a vad típusétól, leveleik kisebbek voltak és számuk is kevesebb volt, mint a kontroll növényeken. A transzgént kifejező növények leveleinek színe viszont üvegházi környezetben némiképp közelített az egészséges kontroll növények levélszínéhez.

Az antiszensz *StubSNF1* növényekbe juttatott és kifejeztetett *TPS1* gén (aST) a WTT növényekhez hasonló megjelenésű transzgénikus növényeket eredményezett. Az *in vitro* növények fejlődésben visszamaradtak vad típusú és antiszensz *StubSNF1* gátolt (aS6) társaikhoz képest. Leveleik sárgásak voltak és rájuk is jellemző volt a bokrosodás. A fenotípusos károsodás mértéke arányos volt az élesztő *TPS1* gén kifejeződésének erősségével.



17. ábra. Az élesztő *TPS1* génjét kifejező transzgénikus növények fenotípusa és a transzgén expressziója. (A) *in vitro* növénykultúra, (B) üvegházban nevelt növények, (C) *TPS1* kifejeződés kimutatása northern hibridizációval, (D) RNS-gélkép hibridizáció előtt

Az antiszensz *StubGAL83* konstrukciót hordozó aG6 növényekben a *TPS1* gén kifejezésre juttatása a WTT és aST növényektől jórészt eltérő fenotípusú növényeket eredményezett. Bár az aGT növényvonalak között is találtunk az előzőekhez hasonló kinézetű, rossz fenotípusú növényeket, de a létrehozott vonalak túlnyomó része vagy normális kinézettel bírt (vad típushoz hasonló, úgy, mint aGT1 és aGT2 az 17. ábrán), vagy pedig a WTT és aST vonalakkal összehasonlítva enyhébben károsodott (aGT3). Az aGT3 növények a vad típushoz képest kis mértékben visszamaradtak a fejlődésben és alsó leveleik hamarabb elsárgultak, mint a kontroll növényeké. A *TPS1* gén kifejeződésének mértéke az aGT vonalaknál nem állt arányban a tapasztalt kismértékű fenotípusos változásokkal.

4.3.3. Az aGT burgonyavonalak szárazságtűrésének vizsgálata

Az élesztő *TPS1* génjének kifejeztetése javítja a burgonya szárazságtűrő képességét (STILLER et al., 2008). Az általunk létrehozott aGT növények szárazságtűrő képességének elemzéséhez három kiválasztott aGT növényvonal (aGT1, aGT2 és aGT3) szárazságtűrését vizsgáltuk meg levett levél teszttel (18. ábra.). A várttal ellentétben azonban megállapítottuk, hogy a transzgénikus növényvonalak szárazságtűrő képessége nem jobb, mint a vad típusú növényeké. Sőt, az aGT3 növényvonal szárazságtűrése még rosszabb is, mint a kontrollé.



18. ábra. aGT növényvonalak szárazságtűrésének vizsgálata levett levél teszttel

4.4. A TPS1 és az StubSNF1 komplex kapcsolatának vizsgálata élesztő két-hibrid rendszerben

Az aGT növények fenotípusa felvetette annak lehetőségét, hogy az élesztő TPS1 és az StubGAL83 között esetleg közvetlen kapcsolat létesülhet. Ennek a kérdésnek a megválaszolására élesztő két-hibrid kísérleteket állítottunk be (19. ábra). Fehérjekombinációnként három-három párhuzamos élesztő klónt teszteltünk. Pozitív kontrollként a burgonya StubSNF1 és StubGAL83 fehérjéit használtuk, negatív kontrollként pedig az élesztő TPS1 fehérjéjét állítottuk párhuzamba az "üres" (csak a GAL4 transzkripciós faktor aktivátor fehérjéjét kifejező) vektorral. A pozitív kontrollon kívül egyik vizsgált kombináció sem adott pozitív eredményt, ami arra utal, hogy az StubGAL83 fehérje, a feltételezésünkkel ellentétben, nem lép kapcsolatba az élesztő TPS1 fehérjéjével. Az StubSNF1 és az élesztő TPS1 közötti kapcsolat vizsgálata élesztő két-hibrid rendszerben szintén negatív eredménnyel járt.



19. ábra. Élesztő két-hibrid kísérletek. K+: pADSNF1pBDGAL83, K-: pBDTPS1-pAD, A: pADTPS1-pBDGAL83, B: pBDTPS1-pADGAL83, C: pADTPS1-pBDSNF1, D: pBDTPS1pADSNF1

4.5. Az aG, aS, aGaS és aGT burgonyavonalak nitrát-reduktáz aktivitása

A nitrát-reduktáz a nitrogén anyagcsere egyik kulcsenzime, mely a nitrátion redukcióját végzi nitritionná. Irodalmi adatok alapján ismerjük, hogy az SNF1-rokon kinázok képesek foszforiláció útján gátolni a nitrát-reduktáz aktivitását (JOSSIER et al., 2009). Növényekben a GAL83 ortológ fehérjék képesek kapcsolatot létesíteni a nitrát-reduktázzal, ami csökkenti az enzim aktivitását (POLGE et al., 2008; LI et al., 2009). Ezeknek a tényeknek az ismeretében

kézenfekvő volt számunkra, hogy a létrehozott transzgénikus növényekben megvizsgáljuk a nitrát-reduktáz aktivitását (20. ábra.).



20. ábra. Nitrát-reduktáz aktivitás. Az ábra felső részén a napi maximum, míg az alsó részén a napi minimum aktivitásértékek láthatók. A (B) illetve (D) ábrarész vonalmegnevezései érvényesek a felettük látható (A) valamint (C) ábrarész megfelelő értékeire is (Az egy csillag 95%-os-, a két csillag pedig 99%-os valószínűségű, jelentős eltérést jelez a vad típushoz képest *t*-teszt alapján.).

A nitrát-reduktáz aktivitása napi ritmust mutat (STITT et al., 2002), ezért a mérés végrehajtására két olyan időpontot választottunk, melyek híven tükrözik a nitrát-reduktáz aktivitásának napi ingadozását. Napkelte után négy órával napi maximum, illetve napnyugta után négy órával napi minimum aktivitást detektáltunk. A törpe fenotípusú kettős antiszensz vonalak közül az aGaS1 vonalnak nappal hasonló volt az aktivitása, mint a vad típusnak, ugyanakkor éjszaka nem lehetett értékelhető enzimaktivitást detektálni. A helyzet még drámaibb volt az aGaS4 vonal esetében, aminél sem nappal, sem pedig éjjel nem tudtunk értékelhető aktivitást mérni. Ezzel szemben az emelkedett gumóhozamú vonalaknál (aGaS6 és aGaS7) nappal és

éjszaka egyaránt jelentősen magasabb enzimaktivitást mértünk, mint a kontroll növényekben. Az antiszensz SNF1 (aS) vonalakban a vad típushoz hasonló értékeket kaptunk a napi maximum és minimum aktivitás tekintetében egyaránt (20. ábra A,B).

A 20. ábra C, illetve D részén az élesztő *TPS1* génjét kifejező vonalak nitrát-reduktáz aktivitásértékei láthatók. Szembetűnő, hogy az egyszeresen módosított növényvonalak (WTT) nappali enzimaktivitás értékei két vonalnál jelentősen, egynél pedig kis mértékben alatta maradtak a vad típusban mért értékeknek. Ezeknél a növényeknél éjszaka egyáltalán nem lehetett enzimaktivitást detektálni. Az antiszensz StubGAL83 és *TPS1* gént kifejező vonalak (aGT) aktivitásértékei ennél jóval kedvezőbbek voltak. A vad típushoz hasonló fenotípusú vonalak (aGT1 és aGT2) esetében éjszaka is lehetett számottevő aktivitást detektálni. A WTT növényeknél jobb, de a vad típushoz képest kissé gyengébb fenotípussal rendelkező aGT3 vonal esetében mértük a legmagasabb nappali aktivitást. Tehát a nitrát-reduktáz ezekben a növényekben összességében véve alacsonyabb aktivitással működik, mint a másik két aGT vonalban. Mindkét kísérletsorozatban szerepeltettük kontroll vonalként az StubGAL83-gátolt aG6 növényeket. Ez a vonal nappal a vad típushoz hasonló aktivitást mutatott, míg éjszaka annál valamivel alacsonyabbat.

4.6. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása a burgonyanövényben fenotípusos károdosáshoz vezet. A módosított növények sótűrő képessége és termőképessége csökken, amelyet gyakran a gumók megváltozott színe és morfológiája kísér.

2. Létrehoztunk és jellemeztünk StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyanövényeket StubGAL83-gátolt vonalak antiszensz *StubSNF1* konstrukcióval történő felültranszformálásával. Kimutattuk, hogy ez a típusú módosítás üvegházi körülmények között a vad típusnál erőteljesebb fenotípusú és annál nagyobb termőképességű növények létrejöttéhez is vezethet. Ezek a nagy termőképességű burgonyavonalak viszont jelentősen kisebb sótűréssel rendelkeznek, mint a nem transzformált kontroll növények.

3. Vad típusú, valamint StubSNF1- és StubGAL83-gátolt növényekben juttattuk kifejezésre az élesztő *TPS1* génjét. Igazoltuk, hogy az StubSNF1 gátlása nem tudja megakadályozni a *TPS1* kifejeződés okozta fenotípusos károsodás létrejöttét, míg az StubGAL83 gátlása képes csillapítani azt.

4. Bebizonyítottuk, hogy az aGaS növények erőteljesebb növekedésének és emelkedett termőképességének-, valamint a *TPS1* kifejeződés okozta károsodások csillapításának hátterében a nitrát-reduktáz aktivitás növekedése áll.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Az StubSNF1 antiszensz gátlása a növények károsodásához vezet

Az SnRK1 családba tartozó enzimkomplexek az egyedfejlődés és az anyagcsere folyamatok központi szabályozó molekulái növényekben (COELLO et al., 2011). Arabidopsis modellnövényben az AKIN10 nevű SnRK1 túltermeltetése számos változást eredményez - több enzim aktivitása és számos cukorszint-szabályozta gén kifejeződése megváltozik (JOSSIER et al., 2009). Ezekben a transzgénikus növényekben gátlódik az embrió-vegetatív és a vegetatívreproduktív fázisátmenet is (TSAI és GAZZARINI, 2012). Burgonyában az SnRK1 aktivitás gumóspecifikus gátlása a szacharóz-szintáz csökkent kifejeződéséhez és az AGPáz redox aktivációjának módosulásához vezet (PURCELL et al., 1998; TIESSEN et al., 2003). A burgonyában legalább kétféle SnRK1 enzim működik: a PKIN1 és az StubSNF1 (MAN et al., 1997; LAKATOS et al., 1997). BECZNER et al. (2010) kimutatták, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása (aS) akár 50%-os enzimaktivitás-csökkenést is eredményezhet. Jelen munkánkban bizonyítottuk, hogy az aS vonalakban a gyökérfejlődés jelentős mértékben visszamarad a kontroll növényekhez képest. Az aS növények zöld tömege is kisebb, mint a módosítás nélküli növényeké. A lassabb gyökérfejlődés és a kisebb zöld tömeg velejárójaként gyakran csökken a gumóhozam is, a gumók sokszor abnormális fenotípusúak, rajtuk úgynevezett "babásodás" figyelhető meg. Az aS növények gumói számos esetben nemcsak alakjukban, hanem színükben is módosulnak, ami csökkenti esztétikai értéküket is (6. ábra). Az enzim kifejeződésének gátlása tehát pleiotropikus hatású, több szinten is megnyilvánuló, súlyos károsodásokhoz vezet. Mindez az StubSNF1 növényfejlődést befolyásoló központi szabályozó szerepének egy újabb bizonyítéka.

5.2. Az StubGAL83 és az StubSNF1 egyidejű gátlásával erőteljesebb növekedésű és nagyobb gumóhozamú burgonyavonalak is létrehozhatók

Kísérleteink során először az StubGAL83-gátolt aG6 vonalat használtuk a kettős antiszensz növények előállítására. Az aG6 növényeket felültranszformáltuk egy antiszensz StubSNF1 konstrukciót hordozó vektorral (aS). A transzformáció olyan kettős antiszensz (aGaS) növényeket eredményezett, melyek három kategóriába sorolhatók: [1] Olyan fejlődésben visszamaradott növények, melyek megváltozott levélmorfológiával és levélszínnel rendelkeznek. Ezek a növények vagy nagyon kisméretű gumókat hoznak létre, vagy pedig egyáltalán nem

kötnek gumót. [2] A kontroll növényekhez hasonló vonalak. [3] A vad típusnál gyorsabban növő növények, melyek a legtöbb esetben nagyobb zöld tömeggel rendelkeznek és gumóhozamuk is felülmúlhatja a transzformálatlan kontrollét. Az aGaS vonalak gumói sem színben, sem pedig formában nem térnek el a kontroll növények gumóitól, szemben az aS növények gumóival. Két kiválasztott magas termőképességű aGaS vonal esetében több, nagy egyedszámú üvegházi kísérletben erősítettük meg nagyobb gumóhozamra való képességüket (10. ábra). Ezzel egyértelművé vált, hogy ezek a vonalak üvegházi körülmények között képesek ismételhetően kiemelkedően magas gumóhozamot produkálni. Két másik aG vonal transzformálásával (aG1 és aG5) azt is bizonyítottuk, hogy nemcsak az aG6 vonalból lehetséges magas termőképességű növényeket előállítani, vagyis, hogy ez a jelenség nemcsak az aG6 vonalra korlátozódik (15. és 16. ábra).

Az aGaS vonalakban az antiszensz gátlást igazoltuk az StubGAL83 esetében (11. ábra), azonban az StubSNF1 gátlásával kapcsolatosan RNS szinten csak az aGaS6 vonalnál tudtunk kismértékű transzkriptum csökkenést kimutatni (12. ábra). Ezzel szemben az aS vonalaknál korábban sikerült RNS szinten gátlást detektálni (SÓS-HEGEDŰS et al., 2005). A 13. ábrán bemutatott kináz aktivitásmérés eredményeként kijelenthető, hogy az StubGAL83 az StubSNF1 pozitív regulátora, ugyanis gátlása jelentős enzimaktivitás csökkenéssel jár. Figyelembe véve az SnRK1-ek kulcsfontosságú szerepét és azt a tényt, hogy az aG növényekben már eleve jelentősen csökkent az SNF1 kináz aktivitás, úgy gondoljuk, hogy az aGaS növényeknél a kináz aktivitás további szignifikáns csökkenése halálos lehet a növényre. Valószínűsítjük, hogy az aGaS növényekben van csökkenés az StubSNF1 RNS szintjében az aG6 vonalhoz képest, de ez olyan kismértékű, hogy northern hibridizációval ezt nem lehetett kimutatni. Emellett lehetségesnek tartjuk azt is, hogy antiszensz növényeink egy részében az StubSNF1 gátlása nem transzkripciós, hanem transzlációs szinten nyilvánul meg (BRODERSEN et al., 2008).

Az aG6 vonalhoz képest csak az aGaS6 vonalnál sikerült számottevő aktivitáscsökkenést kimutatni a szubsztrátként általánosan használt "SAMS" peptiddel. Tudni kell azonban, hogy a "SAMS" peptid nem StubSNF1-specifikus és méri a burgonya másik SnRK1 enzimének, a PKIN1-nek az aktivitását is (BECZNER et al., 2010), ami torzíthatja az eredményeket. Az StubSNF1 és a PKIN1 funkciója viszont eltérő (LOVAS et al. 2003b), így feltételezhetően a PKIN1 nem képes maradéktalanul helyettesíteni az StubSNF1-et, ami a kapott fenotípusos és termőképességet érintő változásokhoz vezetett.

A kiválasztott, magas terméshozamú növényvonalaink abiotikus stressztűrését *in vitro* gyökerezési tesztben vizsgáltuk meg (14. ábra). Ennek eredményeként nyilvánvalóvá vált, hogy a nagy terméshozamú aGaS növények sokkal rosszabbul reagálnak az emelkedett sókoncentrációra, mint a vad típus. A kísérletben kontrollként használt antiszensz StubGAL83 vonal sóérzékenységét csoportunk már korábban bizonyította (LOVAS et al.,2003a). A tesztelt aGaS vonalak még az aG6 vonalnál is sóérzékenyebbnek bizonyultak.

A burgonya gumóhozamának növelésére, a megfelelő tápanyag- és vízellátottság biztosításán kívül, ma már több eljárást is ismerünk. Ezek közül az egyik legérdekesebb POVEDA et al. (2010) megfigyelésén alapul, akik egy kártevő molyfaj (*Teica solanivora*) lárváit használták a burgonya gumóhozamának növelésére. Kimutatták, hogy ha kisszámú molylárva támadja meg a burgonyanövényeket, akkor azok akár két és félszeres gumóhozamot képesek elérni a vad típushoz képest. Bizonyították, hogy a lárva bélrendszerében képződött és kiöklendezett váladék váltja ki a gumóhozam emelkedését.

Genetikai módosítás útján is számos esetben sikerült már a burgonya gumóhozamát emelni. THIELE et al. (1999) Arabidopsis eredetű fitokrómB gént (PhyB) juttattak kifejezésre burgonyában CaMV 35S promóter segítségével. A folyamatosan kifejeztetett gén hatására a növények apikális dominanciája csökkent, a levelek száma, vastagsága és pigmentáltsága megnőtt és a hatékonyabb fotoszintézis következtében a vonalak emelkedett gumóhozamot produkáltak. A gibberellinek gátló hatást fejtenek ki burgonyában a gumóképzésre. A bioszintézisükben szerepet játszó StGA20ox1 gén antiszensz gátlásával a növények hajtáshossza lecsökken, a gumókötés korábbra tolódik és ennek következtében a gumóhozam emelkedik (CARRERA et al., 2000). A burgonya kloroplasztisz eredetű adenilát-kináz enzimének antiszensz gátlása szignifikánsan megemeli a burgonyagumó keményítőtartalmát és a gumóhozamot is (REGIERER et al., 2002). Hasonló eredményt értek el BAROJA-FERNÁNDEZ et al. (2009) azáltal, hogy a citoszolikus szacharóz-szintázt túltermeltették a konstitutív expressziót biztosító CaMV 35S promóter alkalmazásával. A módosított növények gumóhozama megemelkedett és megnőtt a burgonyagumókban az UDP-glükóz, az ADP-glükóz és a keményítő koncentrációja a kontroll növények gumóihoz képest. Burgonyagumóban a keményítő az amiloplasztokban szintetizálódik és raktározódik. A keményítő előállításához elengedhetetlen a glükóz-6-foszfát és az ATP. ZHANG et al. (2008) gumóspecifikus patatin promóter szabályozásával juttatták kifejezésre burgonyában a borsó (Pisum sativum) eredetű glükóz-6-foszfát/foszfát transzlokátor gént (GPT), valamint az Arabidopsis-ból származó

adenilát transzlokátort (*NTT1*). A kétszeresen transzgénikus növényekben a keményítőszintézis fokozásának eredményeként megnőtt a gumók keményítőtartalma és a gumóhozam is. SUN et al. (2011) két rizs eredetű szacharóz transzporter (*SUT*) gént juttatott kifejezésre burgonyanövényekben gumóspecifikus patatin promóter szabályozása alatt. Az egyik transzgént hordozó vonal esetében sikerült 1.9-szeres gumóhozam növekedést elérni a transzformálatlan növényekhez képest. A *SUT* transzgénikus növények átlagos gumómérete azonos volt a kontroll növényekével, azonban a növényenként kötött gumók száma jelentősen megemelkedett és ez eredményezte a majd kétszeres hozamemelkedést.

A fenti példák jól mutatják, hogy sokan és sokféleképpen próbálták már meg genetikai módosítás útján emelni a burgonya gumóhozamát. Eredményesnek bizonyult a szénhidrát metabolizmus gumóspecifikus módosítása, de a fotoszintetikus teljesítmény növelése is. A mi munkánk eredménye egy újabb megközelítés lehetőségére mutat rá. A növényi SnRK1 fehérjék aktivitásának módosítása közvetett módon nemcsak néhány molekula vagy egy-egy életfolyamat működésére van hatással, hanem az egész növényt érintő változásokat generál. Az SNF1-rokon kinázok funkciójának teljes feltérképezése hatalmas kihívást jelent, de a nagyobb gumóhozamot eredményező aGaS növényvonalaink esetében tapasztaltak jól mutatják, hogy mennyire fontos ezeknek a központi szerepet játszó szabályozó molekuláknak és az általuk befolyásolt folyamatoknak a megismerése.

5.3. Az StubGAL83 antiszensz gátlása mérsékli a TPS1 expresszió negatív hatásait

Az élesztő *TPS1* génjének folyamatos kifejeztetése (WTT vonalak) jelentős fenotípusos változásokat okoz *in vitro* és üvegházi körülmények között egyaránt (17. ábra). A növények retardáltak, leveleik fejletlenek és klorotikusak, az üvegházi környezetben pedig többnyire el is pusztulnak. A *TPS1* transzgén kifejeztetése által okozott változások és az StubSNF1 kináz komplex funkciója között kapcsolatot feltételezve antiszensz StubSNF1-, illetve antiszensz StubGAL83 hátterű növényekben is megnyilváníttattuk az élesztő *TPS1* génjét, így kaptuk az aST valamint az aGT vonalakat. Az aST növényvonalak esetében lényegi eltérést nem tapasztaltunk a WTT konstrukciójú növényekhez képest. A növények *in vitro* környezetben még fenntarthatónak bizonyultak, de üvegházban túlnyomórészt ugyanúgy életképtelenek voltak, mint a WTT növények és néhány egyedtől eltekintve elpusztultak még azelőtt, hogy gumót kötöttek volna. A fenotípusos károsodás súlyossága és a transzgén megnyilvánulásának erőssége között egyértelmű összefüggést tapasztaltunk. Ezzel szemben az aGT konstrukciójú vonalak

esetében számos vonalnál jelentős javulást érzékeltünk a WTT és aST vonalakhoz viszonyítva. Az aGT növények többségénél a *TPS1* kifejeződés okozta tünetek vagy mérséklődtek, vagy pedig egyáltalán nem alakultak ki. Ezek a növények mind *in vitro*-, mind pedig üvegházi környezetben kinézetre alapvetően nem különböztek a vad típusú növényektől. A transzgén kifejeződésének erőssége és a vonalak fenotípusa között szoros összefüggést nem lehetett felállítani. Ez az eredmény nyilvánvalóvá tette azt, hogy az StubGAL83 antiszensz gátlása képes mérsékelni, illetve egyes esetekben meggátolni az élesztő *TPS1* gén okozta fenotípusos károsodások kialakulását. A vizsgált aGT vonalak azonban sajnos szárazságtűrés tekintetében is hasonlóan viselkedtek, mint a vad típus, vagyis nem rendelkeztek jobb szárazságtűrő képességgel, mint a kontroll növények (18. ábra). A fenti eredmények alapján élesztő két-hibrid rendszer segítségével megvizsgáltuk, hogy létrejön-e közvetlen kölcsönhatás az StubGAL83 és az élesztő TPS1 fehérjéje között, de nem tudtunk köztük interakciót kimutatni, ami arra utal, hogy az StubGAL83 gátlása nem közvetlen módon csökkenti az élesztő *TPS1* kifejeződése okozta káros hatásokat a burgonyanövényben.

5.4. Az aGT növények fenotípusos javulásának és az aGaS vonalak emelkedett gumóhozamának hátterében a nitrát-reduktáz aktivitás növekedése áll

Az aGaS-, illetve az aGT növények jellemzése után két fontos kérdés merült fel: [1] Hogyan képes az StubGAL83 antiszensz gátlása ellensúlyozni az élesztő *TPS1* működésének negatív hatásait? [2] Mi okozza számos esetben az aGaS vonalak gumóhozam növekedését?

A szakirodalomból tudjuk, hogy az élesztő GAL83 ortológjai *Arabidopsis*-ban képesek kölcsönhatásba lépni a nitrát-reduktáz enzimmel és gátolják annak aktivitását (POLGE et al., 2008; LI et al., 2009). Az is ismeretes, hogy az SNF1 kináz komplex katalitikus alegysége foszforilálja és inaktiválja ezt az enzimet (SUDGEN et al., 1999). Bár az *StubSNF1* gén átírása nem mutat napszakos változást (LOVAS et al., nem közölt eredmény), de az *StubGAL83* gén kifejeződése éjszaka indukálódik (LOVAS et al., 2003a). Ezért úgy gondoljuk, hogy az SNF1 kináz aktivitása alacsony nappal és magas éjszaka a vad típusú növényekben. A nitrát-reduktáz napi aktivitása ehhez képest fordított, az enzim nappal aktívabb és éjjel alacsonyabb szinten működik (20. ábra). Az StubGAL83 és az StubSNF1 antiszensz gátlása megváltoztatja az StubSNF1 komplex alegységeinek arányát, ami befolyásolhatja a nitrát-reduktázra gyakorolt gátló hatás mértékét. Úgy gondoljuk, hogy azokban a vonalakban, melyekben a nitrát-reduktáz aktivitása ejszaka relatíve magas volt (aGaS6 és aGaS7), az StubSNF1 antiszensz gátlása erős. A

magas nitrát-reduktáz aktivitásnak köszönhetően ezek a növények intenzívebben nőnek és magasabb gumóhozamot eredményeznek, mint a vad típus. Az SnRK1 kinázok azonban a nitrát-reduktáz szabályozásán kívül még számos más enzim aktivitását is befolyásolják. Többek között foszforilálják és inaktiválják a szacharóz-foszfát-szintázt (SUDGEN et al., 1999) és szabályozzák az AGPáz aktivitását is (TIESSEN et al., 2003). Csoportunk korábban rávilágított arra, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása módosítja a piruvát-kináz napi aktivitását. A törpe növekedésű és alacsony gumóhozamú aGaS vonalak és a magas terméshozamot elérő aGaS növények között az első kimutatott különbséget a nitrát-reduktáz napi aktivitásában mértük. Több mint valószínű, hogy a nitrát-reduktáz aktivitásának megváltozásán kívül még több más változás is létrejött az aGaS növényekben, melyek részletesebb vizsgálatra érdemesek. Ezek közül elsősorban az SnRK1 enzimkomplexek által közvetlenül befolyásolt folyamatokat kellene megvizsgálnunk, a fent említett enzimek aktivitásának mérését kellene elvégeznünk.

A WTT növényvonalak nitrát-reduktáz aktivitása napi szinten jelentősen elmarad a kontroll növényekhez képest, éjszaka nem is tudtunk kimutatható aktivitást mérni. Ezzel szemben a vad típushoz hasonló aGT növényvonalaknál (aGT1 és aGT2) a nitrát-reduktáz napi aktivitása a vad típusú növényekéhez hasonlóan alakult. Ebből arra következtettünk, hogy az élesztő *TPS1* kifejeztetése burgonyában erősítette az StubSNF1 komplex nitrát-reduktázra gyakorolt gátló hatását. Emellett az aGT növényeknél az StubGAL83 antiszensz gátlása csillapította a TPS1 fehérje hatásait, ami a vad típusú növényekéhez hasonló nitrát-reduktáz

A TPS1 hatására a burgonyanövények szárazságtűrőek lesznek, ugyanakkor fenotípusos változásokat mutatnak (STILLER et al., 2008). Az aGT növények fenotípusosan a vad típushoz képest nem változtak jelentős mértékben, de sajnos szárazságtűrés szempontjából is a kontroll növényekhez hasonlítanak, azaz nem mutatnak fokozott szárazságtűrő képességet. Ebből arra következtethetünk, hogy a *TPS1* transzgén okozta fenotípusosan is megjelenő változások és a jobb szárazságtűrő képesség valószínűleg elválaszthatatlanok egymástól.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A nem redukáló diszacharid trehalóz extrém szárazságűrő képességgel ruházza fel a kiszáradást tűrő növényeket. Az élesztő trehalóz-6-foszfát-szintáz 1 génjének (TPS1) burgonyában történő kifejeztetése szárazságtűrő növényeket eredményez, azonban ezek a növények fenotípusosan károsodottak. A legújabb eredmények arra utalnak, hogy ennek a jelenségnek a hátterében a trehalóz-6-foszfátnak az SnRK1 fehérjékre kifejtett gátló hatása áll. A növényi SnRK1-ek a sucrose non-fermenting 1 (SNF1) rokon kinázok családjába tartoznak, és központi szerepet játszanak a stressz-válaszok és a cukor metabolizmus szabályzozásában. SnRK1 géneket már számos fajból izoláltak és kimutatták, hogy az általuk kódolt fehérjék többnyire heterotrimer enzimkomplexek formájában működnek, hasonlóan az élesztő SNF1 kinázához. Az élesztő SNF1 komplex egy szerin/treonin kinázból (SNF1), egy aktivátor alegységből (SNF4) és egy összekötő alegységből (SIP1, SIP2 vagy GAL83) épül fel, utóbbi alegység összetartja a komplexet és meghatározza annak szubsztrátspecificitását is. Az SnRK1ek szabályozása transzkripcionális és poszt-transzkripcionális szinten egyaránt megnyilvánul, a fehérjék foszforiláció által aktiválódnak és defoszforiláció útján inaktiválódnak. Az inaktiváció alacsony AMP koncentráció fennállása esetén gátolt. Rengeteg fehérje léphet kapcsolatba az SnRK1-ekkel, ami az enzimkomplex bonyolult kölcsönhatási rendszerét hozza létre.

A burgonya legalább két *SnRK1*-et kódol, a *PKIN1*-et és az *StubSNF1*-et, melyek szekvenciája 72%-ban hasonló. Korábban kimutattuk, hogy az StubSNF1 kináz – ellentétben a PKIN1-gyel – kölcsönhatásba lép az élesztő GAL83 burgonyában jelen lévő ortológ fehérjéjével, az StubGAL83-mal és képes komplementálni az élesztő $\Delta snf1$ mutációját is. Emellett azt is kimutattuk, hogy az StubGAL83 antiszensz gátlásának hatására a gyökérfejlődés késedelmet szenved és fokozódik a növények sóstresszel szembeni érzékenysége *in vitro* körülmények között. Az antiszensz StubGAL83 vonalak gumókötése késik, a gumók mérete kisebb lesz, viszont a gumók száma nő a vad típushoz képest.

Jelenlegi munkánknak kettős célja volt: [1] Az StubSNF1 komplex funkcionális analízisének folytatása olyan növények vizsgálatával, melyekben az StubSNF1 kináz működése gátolt, illetve olyan növények létrehozásával, melyekben az StubSNF1 kináz és az StubGAL83 alegység egyaránt gátlás alatt áll. [2] Az élesztő eredetű trehalóz-6-foszfát-szintáz (TPS1) és az StubSNF1 kináz közötti kapcsolat megismerése olyan *TPS1* gént kifejező növényvonalak

vizsgálatával, melyekben vagy az StubSNF1 kinázt, vagy pedig az StubGAL83 alegységet gátoltuk.

Kapott eredményeink rávilágítottak arra, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása – hasonlóan az antiszensz GAL83 vonalaknál tapasztaltakkal – a gyökérfeljődés késését okozza, de még erőteljesebb formában. Az StubSNF1-gátolt növények lassabban nőnek, mint a vad típusú kontroll, kisebb a zöld tömegük és gumóhozamuk is csökkent mértékű. Az StubGAL83 és az StubSNF1 együttes gátlása viszont különféle fenotípusú növényeket eredményez. Három aG vonalat transzformáltunk felül az StubSNF1-specifikus konstrukcióval. A létrehozott kettős antiszensz aGaS növények három kategóriába sorolódtak: [1] olyan lassú növekedésű és megváltozott levélmorfológiájú növények, melyek csak kisszámú és apró gumót képeztek, vagy pedig egyáltalán nem is kötöttek gumót; [2] a kontroll növényekhez hasonló vonalak; valamint [3] a vad típusnál gyorsabban és nagyobb méretűre megnövő növények, melyek több és nagyobb átlagos méretű gumót fejlesztettek, mint a nem transzformált kontroll.

Az élesztő *TPS1* folyamatos kifejeztetése a vad típusú és antiszensz StubSNF1 vonalakban számos fejlődési zavart okozott, míg az antiszensz StubGAL83 növényekben nem, vagy csak enyhe tüneteket váltott ki. Bebizonyítottuk, hogy az StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz növények emelkedett gumóhozama, valamint a *TPS1* expresszió káros hatásainak enyhülése az érintett növényvonalak emelkedett nitrát-reduktáz aktivitásával hozható összefüggésbe. Noha a jelenség hátterében lévő molekuláris mechanizmusok még ismeretlenek, ezek az eredmények egy új lehetőséget kínálnak nagyobb és magasabb terméshozamú haszonnövények létrehozására.

7. SUMMARY

The non-reducing disaccharide trehalose confers extreme drought tolerance to desiccation tolerant plants. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 (*TPS1*) gene confers drought tolerance in potato, however, results in growth aberrations and arrest of development. Recent studies have shown that this phenomenon could be related to the inhibitory effect of trehalose-6-phosphate on SnRK1s, a family of sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinases that link metabolic and stress signalling in plants. *SnRK1* genes have been cloned from many plant species, and it has been shown that the encoded proteins are very likely heterotrimeric enzymes similar to yeast SNF1, which consists of the serine/threonine kinase (SNF1), along with an activating subunit (SNF4) and one of the three cofactors (SIP1, SIP2, or GAL83) that is required for kinase function and confers substrate specificity. SnRK1 is regulated transcriptionally and post-transcriptionally; it is activated by phosphorylation and inactivated by dephosphorylation, which is inhibited by low concentrations of AMP. Different types of proteins can interact with SnRK1s, leading to the emerging complexity of SnRK1 interactions.

The potato genome possesses at least two *SnRK1* kinases, designated *PKIN1* and *StubSNF1*. The sequences of these proteins are 72% similar. Previously, we demonstrated that the StubSNF1 kinase, but not PKIN1, can interact with the potato orthologue of yeast GAL83, designated StubGAL83, and can complement the $\Delta snf1$ yeast mutation. We also showed that antisense repression of StubGAL83 results in a delay in rooting and increases sensitivity to salt stress *in vitro*. Tuberisation of the antisense StubGAL83 lines was delayed and the size of the tubers was reduced, while the number of tubers per plant was increased.

The aim of our recent work was dual: [1] to continue the functional analysis of the StubSNF1 complex by repressing the kinase subunit StubSNF1 and co-repressing it with StubGAL83; and [2] to test the influence of SnRK1 on TPS1 action by expressing the yeast *TPS1* gene in StubSNF1-repressed and StubGAL83-repressed backgrounds.

In this study we demonstrated that the antisense repression of StubSNF1, like antisense repression of StubGAL83, results in a delay in rooting, but in an even more pronounced form. In addition, the antisense StubSNF1 plants grow slower and have a reduced green mass and tuber yield. In contrast, co-repression of StubGAL83 and StubSNF1 leads to diverse phenotypes. Three aG lines were over-transformed with the StubSNF1-specific antisense construct. Three categories of double-transgenic lines were obtained from each transformation: [1] slow-growing

lines with altered leaf morphology, producing only a few small tubers or no tubers at all; [2] plants similar to the controls; and [3] plants growing faster and larger and producing more and larger tubers than the control.

Constitutive expression of *TPS1* in antisense StubSNF1 lines, such as in wild-type plants, leads to serious growth aberrations, while in antisense StubGAL83 background, these effects are attenuated. We provided evidence that the increased size and yield of the StubGAL83-StubSNF1 double antisense plants as well as the attenuation of growth aberrations caused by *TPS1* expression are related to increased nitrate reductase activity. Although the molecular mechanism underlying this phenomenon remains elusive, this finding presents a new means for making larger plants with increased yields for agriculture.

8. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

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. U.S.A.*, 88, 8602-8605. p.

AMASINO, R.M. (1986): Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.*, 152, 305-307. p.

ASHRAF, M. (2010): Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotech. Adv.*, 28, 169-183. p.

ASHRAFI, K., LIN, S.S., MANCHESTER, J.K., GORDON, J.I. (2000): Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae. Genes Dev.*, 14, 1872-1885. p.

AVONCE, N., LEYMAN, B., MASCORRO-GALLARDO, J.O., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J.M., ITURRIAGA, G. (2004): The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Phsiol.*, 136, 3649-3659. p.

AVONCE, N., MENDOZA-VARGAS, A., MORETT, E., ITURRIAGA, G. (2006): Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.*, 6, 109-113. p.

BAE, H., HERMAN, E., BAILEY, B., BAE, H-J., SICHER, R. (2005a): Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Phys. Plantarum*, 125, 114-126. p.

BAE, H., HERMAN, E., SICHER, R. (2005b): Exogenous trehalose promotes non-structural carbohydrate accumulation and induces chemical detoxification and stress response proteins in *Arabidopsis thaliana* grown in liquid culture. *Plant Sci.*, 168, 1293-1301. p.

BAENA-GONZÁLEZ, E., ROLLAND, F., THEVELEIN, J.M., SHEEN, J. (2007): A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448, 938-942. p.

BALL, K.L., DALE, S., WEEKES, J., HARDIE, D.G. (1994): Biochemical characterization of two forms of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase kinase from cauliflower (*Brassica oleracea*). *Eur. J. Biochem.*, 219, 743-750. p.

BALL, K.L., BARKER, J.H.A., HALFORD, N.G., HARDIE, D. G. (1995): Immunological evidence that HMG-CoA reductase kinase-A is the cauliflower homologue of the RKIN1 subfamily of plant protein kinases. *FEBS Lett.*, 377, 189-192. p.

BAROJA-FERNÁNDEZ, E., MUÑOZ, F.J., MONTERO, M., ETXEBERRIA, E., SESMA, M.T., OVECKA, M., BAHAJI, A., EZQUER, I., LI, J., PRAT, S., POZUETA-ROMERO, J. (2009): Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.*, 50, 1651-1662. p.

BECZNER, F., DANCS, G., SÓS-HEGEDŰS, A., ANTAL, F., BÁNFALVI, Z. (2010): Interaction between SNF1-related kinases and a cytosolic pyruvate kinase of potato. *J Plant Physiol.*, 167, 1046-1051. p.

BLÁZQUEZ, M.A., SANTOS, E., FLORES, C.L., MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M., SALINAS, J., GANCEDO, C. (1998): Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.*, 13, 685-689. p.

BONEN, A., HAN, X.X., HABETS, D.D., FEBBRAIO, M., GLATZ, J.F., LUIKEN, J.J. (2007): A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292, E1740-E1749. p.

BOULY, J.P., GISSOT, L., LESSARD, P., KREIS, M., THOMAS, M. (1999): *Arabidopsis thaliana* homologues of the yeast SIP and SNF4 proteins interact with AKINα1, a SNF1-like protein kinase. *Plant J.*, 18, 541-550. p.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254. p.

BRODERSEN, P., SAKVARELIDZE-ACHARD, L., BRUUN-RASMUSSEN, M., DUNOYER, P., YAMAMOTO, Y.Y., SIEBURTH, L., VOINNET, O. (2008): Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190 p.

CARLSON, M., OSMOND, B.C., BOTSTEIN, D. (1981): Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98, 25-40. p.

CARRERA, E., BOU, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L., PRAT, S. (2000): Changes in GA 20oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J.*, 22, 247-56. p.

CELENZA, J.L., CARLSON, M. (1984): Structure and expression of the *SNF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 54-60. p.

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

CELENZA, J.L., CARLSON, M. (1989): Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 5034-5044. p.CHURCH, G.M., GILBERT, W. (1984): Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 81, 1991-1995. p.

CHURCH G.M., GILBERT W. (1984): Genomic sequencing. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 81, 1991-1995. p.

COELLO, P., HEY, S.J., HALFORD, N.G. (2011): The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J. Exp. Bot.*, 62, 883-893. p.

CORTINA, C., CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A. (2005): Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.*, 169, 75-82. p.

CORTON, J.M., GILLESPIE, J.G., HAWLEY, S.A., HARDIE, D.G. (1995): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.*, 229, 558-565. p.

CROWE, J.H. (2007): Trehalose as a "chemical chaperone": fact and fantasy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 594, 143-158. p.

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. *Eur. J. Biochem.*, 186, 123-128. p.

DAVIES, S.P., HELPS, N.R., COHEN, P.T.W., HARDIE, D.G. (1995): 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase- $2C\alpha$ and native bovine protein phosphatase- $2A_c$. *Febs Lett.*, 377, 421-425. p.

DEBAST, S., NUNES-NESI, A., HAJIREZAEI, M.R., HOFMANN, J., SONNEWALD, U., FERNIE, A.R., BÖRNKE, F. (2011): Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol.*, 156, 1754-1771. p.

DEBLAERE, R., BYTEBIER, B., DE GREVE, H., DEBROEK, F., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.*, 13, 4777-4788. p.

DELATTE, T.L., SEDIJANI, P., KONDOU, Y., MATSUI, M., DE JONG, G.J., SOMSEN, G.W., WIESE-KLINKENBERG, A., PRIMAVESI, L.F., PAUL, M.J., SCHLUEPMANN, H. (2011): Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol.*, 157, 160-174. p.

DI SERIO, F., SCHÖB, H., IGLESIAS, A., TARINA, C., BOULDOIRES, E., MEINS, F. (2001): Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 98, 6506-6510. p.

DIETZE, J., BLAU, A., WILLMITZER, L. (1995): *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In *Gene Transfer to Plants* (Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds). Berlin: Springer-Verlag, 24-29. p.

DITTA, G.S., STANFIELD, D., CORBIN, D., HELINSKI, D.R. (1980): Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 7347-7351. p.

DOMBECK, K.M., VORONKOVA, V., RANEY, A., YOUNG, E.T. (1999): Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6029-6040. p.

EASTMOND, P.J., VAN DIJKEN, A.J.H., SPIELMAN, M., KERR, A., TISSIER, A.F., DICKINSON, H.G., JONES, J.D.G., SMEEKENS, S.C., GRAHAM, I.A. (2002): Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant J.*, 29, 225-235. p.

ELBEIN, A.D., PAN, Y.T., PASTUSZAK, I., CARROLL, D. (2003): New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol.*, 13, 17-27. p.

ELBING, K., RUBENSTEIN, E.M., MCCARTNEY, R.R., SCHMIDT, M.C. (2006): Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 393, 797-805. p.

FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6-13. p.

FERNANDEZ, O., BÉTHENCOURT, L., QUERO, A., SANGWAN, R.S., CLÉMENT, C. (2010): Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.*, 7, 409-417. p.

FRISON, M., PARROU, J.L., GUILLAUMOT, D., MASQUELIER, D., FRANÇOIS, J., CHAUMONT, F., BATOKO, H. (2007): The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Lett.*, 581, 4010-4016. p.

FUJI, H., ZHU, J-K. (2009): Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1106, 8380-8385. p.

GARCIA, A.B., ENGLER, J., IYER, S., GERATS, T., VAN MONTAGU, M., CAPLAN, A.B. (1997): Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rtice. *Plant Physiol.*, 115, 159-169. p.

GARG, A.K., KIM, J.K., OWENS, T.G., RANWALA, A.P., CHOI, Y.D., KOCHIAN, L.V., WU, R.J. (2002): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 15898-15903. p.

GIETZ, R.D., WOODS, R.A. (1994): High efficiency transformation in yeast. *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, Oxford University Press, 121-134. p.

GÓMEZ, L.D., BAUD, S., GILDAY, A., LI, Y., GRAHAM, I.A. (2006): Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.*, 46, 69-84. p.

GUO, Y., HALFTER, U., ISHITANI, M., ZHU, J.K. (2001): Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13, 1383-1399. p.

GUO, Y., XIONG, L., SONG, C-P., GONG, D., HALFTER, U., ZHU, J-K. (2002): A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signalling in *Arabidopsis. Dev. Cell*, 3, 233-244. p.

HAGEMAN, R.H., HUCKLESBY, D.P. (1971): Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.*, 23, 491-503. p.

HALFORD, N.G., HEY, S.J. (2009): Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants *Biochem. J.*, 419, 247-259. p.

HAO, L., WANG, H., SUNTER, G., BISARO, D.M. (2003): Geminivirus AL2 and L2 protein interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, 15, 1034-1048. p.

HARDIE, D.G. (2007): AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 774-785. p.

HARRIS, N., FOSTER, J.M., KUMAR, A., DAVIES, H.V., GEBHARDT, C., WRAY, J.L. (2000): Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée): sequence analysis, genomic organization and expression. *J. Exp. Bot.*, 347, 1017-26. p.

HARTHILL, J.E., MEEK, S.E., MORRICE, N., PEGGIE, M.W., BORCH, J., WONG, B.H., MACKINTOSH, C. (2006): Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phoshtate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.*, 47, 211-223. p.

HAWLEY, S.A., SELBERT, M.A., GOLDSTEIN, E.G., EDELMAN, A.M., CARLING, D., HARDIE, D.G. (1995): 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J.Biol. Chem.*, 270, 27186-27191. p.

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 from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271, 27879-27887. p.

HAWLEY, S.A., BOUDEAU, J., REID, J.L., MUSTARD, K.J., UDD, L., MAKELA, T.P., ALESSI, D.R., HARDIE, D.G. (2003): Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.*, 2, 28. p.

HAWLEY, S.A., ROSS, F.A., CHEVTZOFF, C., GREEN, K.A., EVANS, A., FOGARTY, S., TOWLER, M.C., BROWN, L.J., OGUNBAYO, O.A., EVANS, A.M., ET AL. (2010): Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.*, 11, 554-565. p.

HEDBACKER, K., HONG, S.P., CARLSON, M. (2004): Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 8255-8263. p.

HEDBACKER, K., CARLSON, M. (2008): SNF1/AMPK pathways in yeast. Front. Biosci., 13, 2408-2420. p.

HEY, S., MAYERHOFER, H., HALFORD, N.G., DICKINSON, J.R. (2007): DNA sequences from *Arabidopsis* which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J. Biol. Chem.*, 282, 10472-10479. p.

HOLMES, B.F., KURTH-KRACZEK, E.J., WINDER, W.W. (1999): Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.*, 87, 1990-1995. p.

HOLMSTRÖM, K.O., MÄNTYLÄ, E., WELIN, B., MANDAL, A., PALVA, E.T., TUNNELA, O. E., LONDESBOROUGH, J. (1996): Drought tolerance in tobacco. *Nature*, 379, 683-684. p.

HONG, S.P., LEIPER, F.C., WOODS, A., CARLING, D., CARLSON, M. (2003): Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 8839-8843. p.

HONG, S.P., CARLSON, M. (2007): Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 282, 16838-16845. p.

HONIGBERG, S.M., LEE, R.H. (1998): Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 4548-4555. p.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28. p.

ISHITANI, M., LIU, J., HALFTER, U., KIM, CS., SHI, W., ZHU, J.K. (2000): SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 12, 1667-1678. p.
JAGER, S., HANDSCHIN, C., ST-PIERRE, J., SPIEGELMAN, B.M. (2007): AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1α. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *U.S.A.*, 104, 12017-12022. p.

JIANG, R., CARLSON, M. (1996): Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex *Genes Dev.*, 10, 3105-3115. p.

JIANG, R., CARLSON, M. (1997): The Snf1 protein kinase and its activation subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 2099-2106. p.

JOSSIER, M., BOULY, J.P., MEIMOUN, P., ARJMAND, A., LESSARD, P., HAWLEY, S., HARDIE, D.G., THOMAS, M. (2009): SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 59, 316-328. p.

KAHN, B.B., ALQUIER, T., CARLING, D., HARDIE, D.G. (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, 1, 15-25. p.

KARIM, S., ARONSSON, H., ERICSON, H., PIRHONEN, M., LEYMAN, B., WELIN, B., MÄNTYLÄ, E., PALVA, E.T., VAN DIJCK, P., HOLMSTRÖM, K.O. (2007): Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol. Biol.*, 64, 371-386. p.

KIM, M.D., HONG, S.P., CARLSON, M. (2005): Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Eukaryot. Cell*, 4, 861-866. p.

KLEINOW, T., BHALERAO, R., BREUER, F., UMEDA, M., SALCHERT, K., KONCZ, C. (2000): Functional identification of an *Arabidopsis* SNF4 orthologue by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *Plant J.*, 23, 115-122. p.

KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, S., MINAMI, H., KAGAYA, Y., HATTORI, T. (2004): Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*, 16, 1163-1177. p.

KONDRÁK, M., MARINCS, F., KALAPOS, B., JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2011): Transcriptome analysis of potato leaves expressing the trehalose-6-phosphate synthase 1 gene of yeast. *PLoS One*, 6, e23466. p.

KONDRÁK, M., MARINCS, F., ANTAL, F., JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2012): Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.*, 12, 74. p.

KUCHIN, S., TREICH, I., CARLSON, M. (2000): A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 7916-7920. p.

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. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3994-4000. p.

KULMA, A., VILLADSEN, D., CAMPBELL, D.G., MEEK, S.E., HARTHILL, J.E., NIELSEN, T.H., MACKINTOSH, C. (2004): Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6 bisphosphatase. *Plant J.*, 37, 654-667. p.

LAKATOS, L., BÁNFALVI, Z. (1997): Nucleotide sequence of a cDNS clone encoding an SNF1 protein kinase homologue (Accession No. U83797): from *Solanum tuberosum* (PGR97-043). *Plant Physiol.*, 113, 1004. p.

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 J.*, 17, 569-574. p.

LEYMAN, B., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J.M. (2001): An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.*, 6, 510-513. p.

LI, X.F., LI, Y.J., AN, Y.H., XIONG, L.J., SHAO, X.H., WANG, Y., SUN, Y. (2009): AKINbeta1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in *Arabidopsis. J. Integr .Plant Biol.*, 51, 513-520. p.

LO, W., DUGGAN, S.L., EMRE, N.C., BELOTSERKOVSKYA, R., LANE, W.S., SHIEKHATTAR, R., BERGER, S.L. (2001): Snf1 - a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, 293, 1142-1146. p.

LOGEMANN, J., SCHELL, J., WILLMITZER, L. (1987): Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.*, 163, 16-20. p.

LORENZ, D.R., CANTOR, C.R., COLLINS, J.J. (2009): A network biology approach to aging in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 1145-1150. p.

LOVAS, A., BIMBÓ, A., SZABÓ, L., BÁNFALVI, Z. (2003a): Antisense repression of StubGAL83 affects root and tuber development in potato. *Plant J.*, 33, 139-147. p.

LOVAS, A., SÓS-HEGEDŰS, A., BIMBÓ, A., BÁNFALVI, Z. (2003b): Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 321, 123-129. p.

LUMBRERAS, V., ALBÁ, M.M., KLEINOW, T., KONCZ, C., PAGÉS, M. (2001): Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep.*, 2, 55-60. p.

MAHAJAN, S., PANDEY, G.K., TUTEJA, N. (2008): Calcium- and salt-stress signalling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch. Biochem. Biophys.*, 471, 146-158. p.

MAN, A.L., PURCELL, P.C., HANNAPPEL, U., HALFORD, N.G. (1997): Potato SNF1related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptid kinase activity measurements. *Plant Mol. Biol.*, 34, 31-43. p. MARSIN, A.S., BERTRAND, L., RIDER, M.H., DEPREZ, J., BEAULOYE, C., VINCENT, M.F., VAN DEN BERGHE, G., CARLING, D., HUE, L. (2000): Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.*, 10, 1247-1255. p.

MARTÍNEZ-BARAJAS, E., DELATTE, T., SCHLUEPMANN, H., DE JONG, G.J., SOMSEN, G.W., NUNES, C., PRIMAVESI, L.F., COELLO, P., MITCHELL, R.A.C., PAUL, M.J. (2011): Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose-6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol.*, 156, 373-381. p.

MCKIBBIN, R.S., MUTTUCUMARU, N., PAUL, M.J., POWERS, S.J., BURRELL, M.M., COATES, S., PURCELL, P.C., TIESSEN, A., GEIGENBERGER, P., HALFORD, N.G. (2006): Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol. J.*, 4, 409-418. p.

MERRIL, G.M., KURTH, E., HARDIE, D.G., WINDER, W.W. (1997): AICAR decreases malonyl-CoA and increases fatty acid oxidation in skeletal muscle of the rat. *Am. J. Physiol.*, 273, E1107-E1112. p.

MU, J., BROZINICK, J.T., VALLADARES, O., BUCAN, M., BIRNBAUM, M.J. (2001): A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell*, 7, 1085-1094. p.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*,15, 473-479. p.

MÜLLER, J., AESCHBACHER, R.A., WINGLER, A., BOLLER, T., WIEMKEN, A. (2001): Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 417-441. p.

NATH, N., MCCARTNEY, R.R., SCHMIDT, M.C. (2003): Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 3909-3917. p.

OAKHILL, J.S., STEEL, R., CHEN, Z.P., SCOTT, J.W., LING, N., TAM, S., KEMP, B.E. (2011): AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332, 1433-1435. p.

OSTLING, J., RONNE, H. (1998): Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur. J. Biochem.*, 252, 162-168. p.

PAUL, M.J., PRIMAVESI, L.F., JHURREEA, D., ZHANG, Y. (2008): Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 417-441. p.

POLGE, C., JOSSIER, M., CROZET, P., GISSOT, L., THOMAS, M. (2008): Beta-subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKINbeta1-subunit. *Plant Physiol.*, 148, 1570-1582. p.

PONNU, J., WAHL, V., SCHMID, M. (2011): Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Front Plant Sci.*, 2, 70. p.

POVEDA, K., JÍMENEZ, M.I., KESSLER, A. (2010): The enemy as ally: herbivore-induced increase in crop yield. *Ecol. Appl.*, 20, 1787-1793. p.

PURCELL, P.C., SMITH, A.M., HALFORD, N.G. (1998): Antisense expression of a sucrose non-fermenting-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 J.*, 14, 195-202. p.

REGIERER, B., FERNIE, A.R., SPRINGER, F., PEREZ-MELIS, A., LEISSE, A., KOEHL, K., WILLMITZER, L., GEIGENBERGER, P., KOSSMANN, J. (2002): Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.*, 20, 1256-1260. p.

RICHARDS, A.B., KRAKOWKA, S., DEXTER, L.B., SCHMID, H., WOLTERBEEK, A.P., WAALKENS-BERENDSEN, D.H., SHIGOYUKI, A., KURIMOTO, M. (2002): Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 871-898. p.

RUBENSTEIN, E.M., MCCARTNEY, R.R., SCHMIDT, M.C. (2006): Regulatory domains of Snf1-activating kinases determine pathway specificity. *Eukaryot. Cell*, 5, 620-627. p.

SAMBROOK, J., FRITCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANZ, P., ALMS, G.R., HAYSTEAD, T.A.J., CARLSON, M. (2000): Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1321-1328. p.

SÓS-HEGEDŰS, A., LOVAS, A., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, Z. (2005): Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plant Mol. Biol.*, 59, 595-602. p.

SPOONER, D.M., MCLEAN, K., RAMSAY, G., WAUGH, R., BRYAN, G.J. (2005): A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 102, 14694-146999. p.

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 Mol. Biol.*, 11, 255-269. p.

STILLER, I., DULAI, S., KONDRÁK, M., TARNAI, R., SZABÓ, L., TOLDI, O., BÁNFALVI, Z. (2008): Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 227, 299-308. p.

STITT, M., MÜLLER, C., MATT, P., GIBON, Y., CARILLO, P., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W.R., KRAPP, A. (2002): Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53, 959-970. p.

SUDGEN, C., DONAGHY, P., HALFORD, N.G., HARDIE, D.G. (1999): Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methlyglutaryl-coenzime A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol.*, 120, 257-274. p.

SUN, A., DAI, Y., ZHANG, X., LI, C., MENG, K., XU, H., WEI, X., XIAO, G., OUWERKERK, P.B., WANG, M., ZHU, Z. (2011): A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes *OsSUT5Z* and *OsSUT2M. J. Integr. Plant Biol.*, 53, 586-595. p.

SUTHERLAND, C.M., HAWLEY, S.A., MCCARTNEY, R.R., LEECH, A., STARK, M.J., SCHMIDT, M.C. HARDIE, D.G. (2003): Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex *Curr. Biol.*, 13, 1299-1305. p.

THIELE, A., HEROLD, M., LENK, I., QUAIL, P.H., GATZ, C. (1999): Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol.*, 120, 73-82. p.

THOMPSON-JAEGER, S., FRANCOIS, J., GAUGHRAN, J.P., TATCHELL, K. (1991): Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutation which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics*, 129, 697-706. p.

TIESSEN, A., PRESCHA, K., BRANSCHEID, A., PALACIOS, N., MCKIBBIN, R., HALFORD, N.G., GEIGENBERGER, P. (2003): Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.*, 35, 490-500. p.

TOROSER, D., PLAUT, Z., HUBER, S.C. (2000): Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.*, 123, 403-412. p.

TREITEL, M.A., KUCHIN, S., CARLSON, M. (1998): Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6273-6280. p.

TSAI, A.Y., GAZZARRINI, S. (2012): AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *Plant J.*, 69, 809-821. p.

TU, J., CARLSON, M. (1995): REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14, 5939-5946. p.

UMEZAWA, T., YOSHIDA, R., MARUYAMA, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (2004): SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-response gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 101, 17306-17311. p.

VAN DIJKEN, A.J., SCHLUEPMANN, H., SMEEKENS, S.C.M. (2004): Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.*, 135, 969-977. p.

VAN LOON, D.C. (1981): The effect of water stress on potato growth, development and yield. *Am. Potato J.*, 58, 51-69. p.

VERVLIET, G., HOLSTERS, M., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. (1975): Characterisation of different plaque forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.*, 26, 33-48. p.

VINCENT, O., TOWNLEY, R., KUCHIN, S., CARLSON, M. (2001): Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.*, 15, 1104-1114. p.

VOGEL, G., AESCHBACHER, R.A., MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A. (1998): Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.*, 13, 673-683. p.

WANG, R.C., LEVINE, B. (2010): Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett.*, 584, 1417-1426. p.

WANG, Z., WILSON, W.A., FUJINO, M.A., ROACH, P.J. (2001): Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Anf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5742-5752. p.

WIGGERS, H. A. L. (1832): Untersuchung über das Mutterkorn, Secale cornutum. *Annalen der Pharmacie* 1, 129–182. p.

WOODS, A., MUNDAY, M.R., SCOTT, J., YANG, X., CARLSON, M., CARLING, D. (1994): Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 269, 19509-19516. p.

XIAO, B., SANDER, M.J., UNDERWOOD, E., HEATH, R., MAYER, F.V., CARMENA, D., JING, C., WALKER, P.A., ECCLESTONE, J.F., HAIRE, L.F., ET AL. (2011): Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472, 230-233. p.

YANG, X., JIANG, R., CARLSON, M. (1994): A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast Snf1 protein kinase complex. *EMBO J.*, 13, 5878-5886. p.

YOUNG, E.T., DOMBEK, K.M., TACHIBANA, C., IDEKER, T. (2003): Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.*, 278, 26146-26158. p.

ZHANG, L., HÄUSLER, R.E., GREITEN, C., HAJIREZAEI, M.R., HAFERKAMP, I., NEUHAUS, H.E., FLÜGGE, U.I., LUDEWIG, F. (2008): Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotechnol. J.*, 6, 453-464. p.

ZHANG, Y., PRIMAVESI, L.F., JHURREEA, D., ANDRALOJC, P.J., MITCHELL, R.A.C., POWERS, S.J., SCHLUEPMANN, H., DELATTE, T., WINGLER, A., PAUL, M.J. (2009): Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.*, 149, 1860-1871. p.

M2. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Szakcikkek folyóiratokban

ANTAL, F., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, Z. (2012): Influence of the StubSNF1 kinase complex and the expression of the yeast *TPS1* gene on growth and tuber yield in potato. *Plant Growth Regul.* – DOI: 10.1007/s10725-012-9746-7 IF: 1.604

KONDRÁK, M., MARINCS, F., **ANTAL, F.**, JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2012): Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.*, 12, 74. p. IF: 3.45

BECZNER, F., DANCS, G., SÓS-HEGEDŰS, A., **ANTAL, F.**, BÁNFALVI, Z. (2010): Interaction between SNF1-related kinases and a cytosolic pyruvate kinase of potato. *J. Plant Physiol.* 167, 1046-1051. p. IF: 2.85

BECZNER, F., ANTAL, F., BÁNFALVI, ZS (2010): A burgonya Y vírus HC-Pro és a burgonya StubGAL83 fehérjéjének kapcsolata. *Növényvédelem* 46, 226-232. o.

ANTAL, F., BÁNFALVI, ZS. (2010): Genetikailag módosított burgonyafajták. *Agrofórum* 21, 110-111. o.

Szakmai előadások

ANTAL, F., BECZNER, F., STILLER, I., NYIKÓ, T., SILHAVY, D., PALKOVICS, L., BÁNFALVI, ZS. (2011): Új elem a vírusok és növények párharcában: A PVY HC-PRO és a burgonya StubGAL83 fehérjéjének kapcsolata. XVII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2011. április 27. Összefoglaló 50. o.

BECZNER, F., **ANTAL, F.**, STILLER, I., BÁNFALVI, ZS. (2009): Az SNF1 protein-kináz kapcsolata a burgonya Y vírus HC-Pro fehérjéjével burgonyában. MBK-Napok, Gödöllő, 2009. november 30-december 1.

ANTAL, F. (2008): Molekuláris nemesítéssel létrehozott magas terméshozamú burgonya. Fiatal kutatók az élhető Földért - MTA Magyar Tudomány Ünnepe, FVM központi rendezvény, Budapest, 2008. november 24.

ANTAL, F., DANCS, G., BECZNER, F., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2006) Befolyásoljae az StubSNF1 komplex aktivitása a burgonya TPS1 expresszión alapuló szárazságtűrését? MBK Napok, Gödöllő, 2006. november 27- 28.

Konferencia összefoglalók (poszterek)

SÓS-HEGEDŰS, A., JUHÁSZ, Z., **ANTAL, F**., KONDRÁK, M., MAUCH-MANI, B., BÁNFALVI, Z. (2012): Chemical priming of the drought tolerance in potato. 9th Solanaceae Conference, Neuchatel, Switzerland, 2012. augusztus 26-30., Abstract 185. p.

ANTAL, F., BECZNER, F., STILLER, I., NYIKÓ, T., SILHAVY, D., PALKOVICS, L., BÁNFALVI, Z. (2012): A new element in the fight between plants and viruses: The HC-Pro protein of PVY inhibits the StubSNF1 kinase complex in potato. Advances in Plant Breeding and Plant Biotechnology in Central Europe, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Debrecen, June 4-6, Abstract 30-31. p.

KONDRÁK, M., MARINCS, F., **ANTAL, F.**, JUHÁSZ, Z., BÁNFAVI, Z. (2012): Transcriptional and metabolic changes elicited by drought stress in *TPS1*-expressing potato leaves. Advances in Plant Breeding and Plant Biotechnology in Central Europe, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Debrecen, June 4-6, Abstract 47-48. p. **ANTAL, F.**, KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2012): Magas terméshozamú burgonyavonalak létrehozása molekuláris nemesítéssel. XVIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2012. március 6., Összefoglaló 55. o.

ANTAL, F., DANCS, G., BECZNER, F., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2007): A *TPS1* expresszión alapuló szárazságtűrés és az StubSNF1 komplex működése közötti kapcsolat vizsgálata burgonyában. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2007. március 12. Összefoglaló 104. o.

ANTAL, F., HORVÁTH, GY., MÁTICS, R., PUTNOKY, P. (2005): Az északi pocok mtDNS kontroll régiójának elemzése. V. Magyar Genetikai Kongresszus XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005. április 10-12. Összefoglaló 115. o.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Nagy Ferencnek és Dr. Kiss György Botondnak, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont korábbi főigazgatóinak, valamint az intézet jelenlegi vezetőjének, Dr. Burgyán Józsefnek, amiért lehetőséget nyújtottak számomra a munkám elvégzéséhez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Zsófiának, a kísérletek hátterének biztosításáért, valamint az elméleti és gyakorlati útmutatásokért.

Köszönet illeti a Molekuláris Növényfiziológia és Biokémia Csoport korábbi és jelenlegi munkatársait a kísérleteimhez nyújtott szakmai tanácsokért és az inspiráló munkakörnyezet fenntartásáért.