

# SZENT ISTVÁN EGYETEM

# A burgonya SNF1 protein kináz komplexének vizsgálata

Doktori értekezés

**Beczner Farkas** 

Gödöllő 2011

## A doktori iskola

megnevezése:	Növénytudományi Doktori Iskola		
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok		
vezetője:	Dr. Heszky László egyetemi tanár, az MTA rendes tagja SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet		
témavezető:	Dr. Bánfalvi Zsófia tudományos tanácsadó, az MTA doktora Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont		

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

# TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE6		
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7	
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10	
2.1. Az SNF1 protein-kináz család	10	
2.1.2. Az élesztő SNF1 protein-kináza	11	
2.1.3. Az emlősökben lévő AMP által aktivált protein-kinázok (AMPK-k)	12	
2.1.4. A növények SNF1-rokon kinázai (SnRK-k)	14	
2.1.4.1. A SnRK1 család	14	
2.1.4.2. A burgonya SnRK1-ei	18	
2.2. A piruvát-kináz szerepe a növényekben	20	
2.2.1. A növények légzése	20	
2.2.2. A piruvát-kináz (PK)	23	
2.3. Növényi vírusok és a növények vírusfertőzésre adott válaszai	24	
2.3.1. Növényi vírusok	24	
2.3.2. A növények vírusfertőzésre adott válaszai		
2.3.2.1. Géncsendesítés		
2.3.2.2. Anyagcsere módosítás	29	
2.3.3. A növények védekező mechanizmusainak szuppresszálása		
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK		
3.1. Vegyszerek		
3.2. Plazmidok		
3.3. Táptalajok		
3.4. Baktérium és élesztő törzsek		
3.5. A növények nevelése és fenntartása		
3.6. PVY vírus tisztítása növényből		
3.7. Növények fertőzése PVY vírussal		
3.8. Molekuláris biológiai módszerek		

3.8.1. Plazmid DNS tisztítása és emésztése endonukleázokkal	36
3.8.2. Élesztő RNS tisztítása	37
3.8.3. Össz-nukleinsav kivonás növényből	37
3.8.4. cDNS szintézis	37
3.8.5. Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR)	38
3.8.6. DNS fragmentumok elválasztása és izolálása	39
3.8.7. DNS fragmentumok klónozása	39
3.8.8. Kompetens sejt készítés	40
3.8.9. Plazmid DNS bejuttatása a baktérium sejtekbe	40
3.8.10. Élesztő rendszerben végzett kísérletek	40
3.8.10.1. Élesztő transzformálása	40
3.8.10.2. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása két-hibrid rendszerben	41
3.8.11. Northern hibridizáció	41
3.8.11.1. Filter készítés	41
3.8.11.2. DNS jelölése radioaktív izotóppal	41
3.8.11.3. Hibridizációs körülmények	42
3.9. Fehérjék méret szerinti elválasztása (FPLC)	42
3.9. Piruvát-kináz (PK) aktivitás mérés	42
3.10. Kináz aktivitás mérés SAMS szubsztráttal	43
4. EREDMÉNYEK	45
4.1. A burgonya SnRK1 fehérjéi és a PKc kapcsolatának vizsgálata	45
4.1.1. Burgonya SnRK1 szubsztrátok keresése	45
4.1.2. Az antiszensz burgonya vonalak SAMS-peptid foszforilációs aktivitása	47
4.1.3. Az antiszensz burgonya vonalak PK aktivitása	49
4.1.4. Az antiszensz burgonya vonalak fehérjéinek elválasztása, FPLC-frakcióinak PK	
aktivitása	51
4.2. A burgonya SnRK1 fehérjéi és a PVY HcPro fehérjéje közti kapcsolat vizsgálata	53
4.2.1. A kapcsolat kimutatása	53
4.2.2. A StubGAL83 és a PVY HcPro fehérje kapcsolatának igazolására készített kontrol	11
northern kísérlet	54
4.2.3. A StubGAL83 és a PVY HcPro fehérje kapcsolatához szükséges HcPro régió	
lokalizálása	55
4.2.3.1. A klónozási stratégia	55

4.2.3.2. A két-hibrid kísérletek	56
4.2.4. Vírusfertőzési kísérletek	57
4.2.4.1. A kísérletekhez szükséges víruskoncentráció meghatározása	57
4.2.4.2. Az aG növények PVY fogékonysága	
4.9. Új tudományos eredmények	60
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	62
5.1. A burgonya SnRK1 komplexei befolyásolják a PK <sub>c</sub> aktivitást	62
5.2. A StubGAL83 kapcsolódni tud a PVY vírus HcPro fehérjéjéhez	65
6. ÖSSZEFOGLALÁS	69
7. SUMMARY	71
8. MELLÉKLETEK	73
M1. IRODALOMJEGYZÉK	73
M2. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	90
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	92

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AL2	A TGMV geminivírus fehérjéje, kapcsolatba lép a dohány egyik SnRK1-éve	
ATP	Adenozin trifoszfát	
BSA	Szarvasmarha szérum fehérje (bovine serum albumin)	
DTT	ditiotreitol	
FPLC	Gyors fehérje folyadékkromatográfia (Fast protein liquid chromatography)	
HcPro	A PVY vírus fehérjéje, Helper component	
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim-A (HMG-CoA) reduktáz	
L2	A BCTV geminivírus fehérjéje, kapcsolatba lép a dohány egyik SnRK1-ével	
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid	
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid	
NADH	A NAD redukált formája	
NR	nitrát-reduktáz	
PEP	foszfoenol-piruvát	
РК	piruvát-kináz	
PK <sub>c</sub>	A piruvát kináz sejtplazmában előforduló változata	
PKIN1	A burgonya egyik SnRK1-e	
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid	
PVY	Burgonya Y vírus (potato virus Y)	
SAMS	Az SNF1 kinázok általános szubsztrátja (HMRSAMSGLHLVKRR)	
SNF	sucrose non-fermenting	
SnRK1	A növények SNF1 szerű kinázai (SNF1 related kinase)	
SPS	Szaharóz-6-foszfát-szintáz	
SSC	nátrium-klorid és nátrium-citrát puffer (saline-sodium citrate)	
stubGAL83	A burgonya SNF1 kináz komplexének β alegysége	
stubSNF1	A burgonya SNF1 kináz komplexének α alegysége	

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A burgonya - a kukorica, búza és rizs után - a legfontosabb élelmiszernövényünk. Világszerte több országban termesztik és fogyasztják, mint bármely más kultúrnövényt. A világ burgonyatermését hét termesztett gumós *Solanum* faj alfajai és fajtái adják, míg a *Solanum* nemzetség kilenctizede (közel 1800 faj) egyáltalán nem képez gumót (HAWKES, 1994). A burgonya, az emberi táplálkozáson kívül, az állati takarmányozásban is fontos szerepet tölt be. A gumó kialakulásának és fejlődésének kutatása ezért mind biológiai, mind pedig gazdasági szempontból, jelentős feladat.

A burgonyagumó földalatti szárrész, tápanyag-raktározó szerv, amellyel a növény vegetatívan is képes szaporodni. A burgonyagumó szárazanyag-tartalma 13-35% között van. A szárazanyag legnagyobb részét a keményítő teszi ki (75-80%). A gumó keményítőtartalma fajtától függően 12-24%, fehérjetartalma pedig 0,7-4,6% között van. A keményítőtartalmat kedvezően befolyásolja, ha a gumóképződés idején az időjárás napfényes, hűvös és csapadékos. A nagyobb keményítőtartalmú fajták pürékészítésre, illetve ipari feldolgozásra (szeszgyártás) alkalmasak. A kisebb keményítőtartalmú fajták csak friss fogyasztásra vagy tartósítóipari célra használhatók, nehezen tárolhatók. A burgonyafehérje jó biológiai értékű, jól emészthető, és bizonyos esszenciális aminosavakban még gazdag is, pl. leucin, lizin. A gumó gazdag vitaminokban: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, C, D, K<sub>1</sub>-vitamint tartalmaz. Ezek közül számunkra különösen a C-vitamin a fontos. A konyhatechnikai feldolgozás azonban lényegesen befolyásolja, hogy a burgonyából készült ételekben mennyi vitamin és ásványi anyag marad. A "héjában" főtt és sütött burgonyában a vitaminok nem bomlanak el, így az vitamin- és ásványianyag szükségletünk fedezésére alkalmas. Ezzel szemben a hámozott gumók C-vitaminjából sok ásványisó-tartalom főzőlében elbomlik, az harmada pedig a marad (http://kkvka.georgikon.pate.hu/tech/burgonya.htm).

A gumó fejlődésének legjellegzetesebb eleme a nagy mennyiségű szénhidrát felhalmozódása. A szénhidrát-anyagcsere megismerése világszerte a kutatások homlokterében áll. A szénhidrát-anyagcsere megismerésének eukarióta modellje az élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae*. *Az* élesztőben a szénhidrát-anyagcsere szabályozásának kulcsenzime az SNF1 (Sucrose Non-Fermenting 1) kináz, ami részt vesz a katabolit represszió szabályozásában, a glikogén felhalmozódás szabályozásában, foszforiláció révén módosítja számos metabolikus enzim aktivitását és transzkripciós faktor DNS-kötését, mintegy központi regulátorként irányítja a sejt anyagcsere-folyamatait a rendelkezésre álló szénforrás függvényében (POLGE és THOMAS, 2006; BAENA-GONZÁLEZ, 2008).

7

Az élesztő SNF1 és a növényi SNF1-rokon kinázok 1. típusa (SnRK1) között jelentős szekvencia hasonlóság van. Több növényi SnRK1-ről kimutatták, hogy képes az élesztő  $\Delta$ Snf1 mutáns fenotípusát helyreállítani (ALDERSON és mtsai, 1991; MURANAKA és mtsai, 1994; BHALERAO és mtsai, 1999; LOVAS és mtsai, 2003). Ez arra utal, hogy az élesztő és a növényi SnRK1-ek között funkcionális hasonlóság van. Feltételezhető, hogy a növény fejlődése során zajló szénhidrát-metabolizáló folyamatok szabályozásában a növényi SnRK1-ek fontos szerepet játszanak. Ezért kezdte el munkacsoportunk a burgonya SnRK1-ek vizsgálatát. Lakatos Lóránt izolált és részlegesen jellemzett két *SnRK1* cDNS-t, a *PKIN1*-et és *StubSNF1*-et, valamint egy, a StubSNF1-gyel interakcióba lépő fehérjét kódoló cDNS-t, a *StubGAL83*-at (LAKATOS és BÁNFALVI, 1997; LAKATOS és mtsai, 1999), Lovas Ágnes pedig részletesen jellemzett ezeket a géneket és antiszensz transzgénikus növények fenotípusának vizsgálatából következtetett az általuk kódolt fehérjék funkciójára (LOVAS, 2003).

A Lakatos Lóránt és Lovas Ágnes által végzett kísérletek folytatásaként, célul tűztük ki a PKIN1, StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék működésének még részletesebb megismerését, az antiszensz transzgénikus növényekben lévő PKIN1 és StubSNF1 enzimek együttes aktivitásának mérését, a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában betöltött szerepük vizsgálatát, a piruvát-kináz enzimmel való kapcsolatuk feltárását.

A magyarországi burgonyatermesztés több sebből vérzik. A rendszerváltás óta a burgonya termőterülete jelentősen csökkent. Magyarországi termesztésének egyik legkritikusabb eleme az öntözés, e nélkül gazdaságos termesztése rendkívül bizonytalan. A termesztés gazdaságosságát erősen befolyásoló tényezők még a különböző, a burgonyát sújtó betegségek. Ezek ellen való védekezés jelentős összegeket emészt fel évről évre. A legtöbb kártevő és kórokozó ellen van gyógymód, a vírusokkal szemben azonban nincs, csak a megelőzés lehetséges. A legnagyobb igyekezet ellenére is előfordulhat azonban, hogy jelentős termésveszteséget okoznak a különböző vírusfertőzések. Ezért rendkívül fontos a vírusok fertőzési folyamatának, a vírusok elleni növényi védekezés elemeinek, és a vírusok ezekre tett válaszlépéseinek minél alaposabb megismerése. A burgonyakultúrák egyik legjelentősebb vírus-kórokozója a potyvírusok közé tartozó burgonya Y vírus (potato virus Y, PVY).

Dohány növényeken végzett kísérletekből kiderült, hogy két geminivírus fehérje, az AL2 és az L2 inaktiválja a dohány SnRK1-ét (HAO és mtsai, 2003). A SnRK1 inaktivációja megnövekedett fogékonyságot idézett elő a különböző vírusfertőzésekre. A két vírusfehérje aminosav szekvenciájának analízise során kiderült, hogy egyik sem tartalmaz SNF1 foszforilációs konszenzus szekvenciát, így a kapcsolat nem egy egyszerű kináz-szubsztrát kölcsönhatás. A megnövekedett fogékonyság nem a fertőzés súlyosbodását jelentette, hanem a lappangási idő, illetve a fertőzéshez szükséges vírus-inokulum töménység csökkenését (az

infekciós dózist). Ezzel összhangban, a SnRK1 túltermeltetése megnövelte a dohánynövények vírusokkal szembeni ellenálló képességét (HAO és mtsai, 2003).

A burgonya Y vírus funkcionálisan hasonló fehérjéjét és génjét, a *HcPro*-t Dr. Palkovics László és mtsai (BCE KTK, Növényvédelmi Tanszék és MBK, Gazda-patogén Kölcsönhatás Csoport) izolálták és jellemezték. A HcPro fehérje többfunkciós. Ismert, hogy egyik funkciója a géncsendesítés szupressziója, vagyis a növény védekezési folyamatának gátlása, a vírustranszkripció és terjedés segítése. Noha a funkcionális hasonlóság nem párosul gyakorlatilag semmiféle szekvencia-homológiával, úgy gondoltuk, ha működik a geminivírusokéhoz hasonló rendszer a PVY esetében, akkor azt a HcPro házatáján kell keresnünk.

Ebből kiindulva, célul tűztük ki a burgonya SnRK1 komplexei és a burgonya Y vírus HcPro fehérjéje között feltételezhetően létrejövő kapcsolat kimutatását és jellemzését.

### 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 2.1. Az SNF1 protein-kináz család

Az eukarióta sejteknek igen gyorsan kell reagálniuk a belső és külső változásokra. Ezek a változások rendkívül sokfélék lehetnek: hormonok, növekedési faktorok, különböző anyagcseretermékek mennyiségi és minőségi változásai, miközben különböző környezeti stresszhatások is érik a sejteket. A környezetből érkező jeleket a sejt felszínén lévő receptorok érzékelik, amire a sejtek különböző jelátviteli mechanizmusok és útvonalak segítségével válaszolnak, és aminek az eredménye lehet például egy enzim aktiválása, vagy egy gén expressziójának a megváltozása. A jelátvitel kulcsmechanizmusa a reverzibilis fehérje-foszforiláció, amit különböző protein-kinázok katalizálnak (MAN és mtsai, 1997).

Az eukarióta protein-kinázok szupercsaládját - a kináz domén szekvenciája alapján -HANKS és HUNTER (1995) öt főcsaládba sorolta. Mindegyik család tagja tartalmaz egy-egy jellegzetes kináz domént, ami körülbelül 250-300 aminosav hosszúságú, és amiben 11 erősen konzervált régió helyezkedik el (HANKS és HUNTER, 1995; MAN és mtsai, 1997). Az a tény, hogy az egyes csoportokba sorolt rokon kinázok egymástól akár igen távolálló fajokból származnak, azt jelzi, hogy ezek a fehérjék, és az általuk szabályozott folyamatok, rendkívül ősiek, és még abból az időből származnak, amikor még nem vált szét az evolúció során a gombák, a növények és az állatok fejlődése (MAN és mtsai, 1997).

Az SNF1 kinázok a CaMK főcsaládba tartoznak, és az állati kalcium- és kalmodulinfüggő protein-kinázokkal (CaMK) és a növényi kalcium-függő és kalmodulin-független proteinkinázokkal (CDPK) szoros rokonságban vannak. Jóllehet az SNF1 család egy önálló csoport, de a kináz domén hasonlósága a másik két csoporthoz olyan nagymértékű, hogy átfedések is lehetnek a szubsztrát-specificitásban. Például, a spenót nitrát-reduktázát nemcsak CDPK-ák, de az egyik növényi SNF1 kináz is tudja foszforilálni (HALFORD és HARDIE, 1998). Az egyes csoportokba tartozó kinázok C-terminális doménja azonban kevésbé konzervált, mint az Nterminálison elhelyezkedő katalitikus domén, és ez lehetővé teszi az SNF1 kinázok eltérő szabályozását és eltérő célpontokhoz való kapcsolódását (STONE és WALKER, 1995).

Az SNF1 protein-kináz család tagjainak, a különböző metabolikus útvonalak szabályozása révén, szerepe van a környezeti hatásokra adott sejtszintű válaszok kialakulásában (STONE és WALKER, 1995). Az élővilágban általánosan előforduló, az SNF1 protein-kináz

családba tartozó enzim-komplexek szerkezete, működése, célszekvenciája és szabályozása nagyon hasonló.

Az SNF1 protein-kináz család legismertebb tagja a *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 kináza. Az SNF1 kináz állatokban megtalálható ortológjai az adenozin-monofoszfát-aktivált protein-kinázok (AMPK-k), a növényekben pedig a SNF1-rokon kinázok (SnRK-k).

#### 2.1.2. Az élesztő SNF1 protein-kináza

Az élesztőben számos gén expressziója gátlódik (represszálódik), ha a környezet glükóz-ellátása bőséges. Ezt a folyamatot nevezik katabolit repressziónak. Az élesztő *SNF1* génje egy 72 kDa nagyságú szerin/treonin kinázt kódol, ami elsősorban a glükózhiány esetén expresszálódó gének gátlás alóli felszabadításához szükséges (derepresszálás) (CARLSON és mtsai, 1981; CELENZA és CARLSON, 1986). Ez a folyamat biztosítja, hogy az élesztő alternatív szénforrásokat (galaktóz, maltóz, szacharóz, etanol, glicerin) is fel tudjon használni, miközben különböző stresszgének aktiválását is elindítja (ALEPUZ és mtsai, 1997; TAMAI és mtsai, 1994). Emellett azonban az SNF1 számos egyéb alapvető biológiai folyamat szabályozásában is szerepet játszik. Így részt vesz a sporuláció, a glikogén-felhalmozás, a peroxiszóma biogenezis és a sejtosztódás szabályozásában is, és képessé teszi a sejteket arra, hogy tápanyagszegény körülmények között leállítsák az osztódást (HUBBARD és mtsai, 1992; HARDY és mtsai, 1994; SIMON és mtsai, 1992; THOMPSON-JAEGER és mtsai 1991).

Az élesztő SNF1 fehérjéje az SNF1 kináz komplex részeként működik. Ezt a komplexet három fehérje alkotja: [1] a katalitikus  $\alpha$ -alegység (SNF1), [2] az összekötő  $\beta$ -alegység (SIP1, SIP2, vagy GAL83), [3] az aktivátor  $\gamma$ -alegység (SNF4). Az SNF1 alegység N-terminális részén a katalitikus domén (KD), a C-terminális részén a reguláló domén (RD) helyezkedik el (CELENZA és CARLSON, 1986). Kis glükóz koncentráció esetén az SNF4 kapcsolódik az SNF1 alegység reguláló doménjéhez, és ezáltal aktiválja. Az élesztőben különböző összekötő alegységek (SIP1/SIP2/GAL83) vehetnek részt a komplex felépítésében. Az összekötő alegységek felépítése hasonló, mindegyiken megtalálható az a két domén, amelyekhez az SNF1 (Kinase Interacting Sequence, KIS domén), illetve a SNF4 (Association with the SNF4 Complex, ASC domén) kapcsolódik. Funkciójuk, az alegységek összetartásán kívül, a szubsztrát-specificitás meghatározása, valamint a komplex különböző szignáltranszdukciós útvonalakba történő irányítása (JIANG és CARLSON, 1997; VINCENT és CARLSON, 1999). Az összekötő alegységek, a szénforrások minőségének és mennyiségének függvényében, a komplex sejten belüli lokalizációját is befolyásolják. Glükóz-megvonás esetén a SIP1 a vakuólumba, a SIP2 a citoplazmába, a GAL83 pedig a sejtmagba szállítja a komplexet (VINCENT és mtsai, 2001).

A komplexet alacsony glükóz-szint esetén különböző protein-kinázok, a STD1, PAK1, TOS3 és ELM1, foszforilálják. Ezáltal megszűnik a fehérje katalitikus és regulátor doménje közötti kapcsolat, és lehetővé válik, hogy az SNF4 kapcsolódjon a regulátor doménhez és aktiválja az SNF1-et (KUCHIN és mtsai, 2003; HONG és mtsai, 2003). A glükóz koncentrációtól függetlenül az SNF1 kináz komplexet a GLC7 protein-foszfatáz defoszforilálással inaktiválhatja (JIANG és CARLSON, 1996).

Az SNF1 protein-kináz komplex transzkripciós faktorok foszforilálása révén részt vesz a transzkripció szabályozásában is. Három SNF1 által szabályozott szekvencia-specifikus transzkripciós faktor ismert: a MIG1, a SIP3 és a SIP4 (TRUMBLY, 1992; LESAGE és mtsai, 1994; VINCENT és CARLSON, 1999). Az SNF1 a transzkripció szabályozásában más módon is részt vehet. Például, foszforilálhatja a H3 hiszton-fehérjét, de az RNS-polimeráz II-vel is kölcsönhatást tud létesíteni (LO és mtsai, 2001; KUCHIN és mtsai, 2000). A transzkripciós szabályozás mellett az SNF1 protein-kináz komplex a citoplazmában részt vesz az acetil-koenzim-A-karboxiláz (ACC-áz), a zsírsav bioszintézis kulcsenzimének szabályozásában is (WOODS és mtsai, 1994).

#### 2.1.3. Az emlősökben lévő AMP által aktivált protein-kinázok (AMPK-k)

A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A-reduktáz (HMGR) szabályozását vizsgálva kiderült, hogy a HMGR foszforiláció révén inaktiválódik, de a foszforilációt végző enzim maga is foszforiláció/defoszforiláció révén szabályozódik (BEG és mtsai, 1978). Később bebizonyították, hogy a HMGR-t foszforiláló enzim ATP jelenlétében inaktív, de AMP feldúsulása esetén gyorsan aktiválódik, ezért elnevezték AMP által aktivált protein-kináznak, rövidítve AMPK-nak (FERRER és mtsai, 1985; HARDIE és mtsai, 1989).

CARLING és mtsai (1989) megállapították, hogy az AMPK egy három fehérjéből álló kináz komplex, melynek tagjai 63 ( $\alpha$ ), 35 ( $\beta$ ) és 38 ( $\gamma$ ) kDa nagyságúak. A további kutatások során kiderült, hogy a komplex felépítésében, az alegységek funkciójában és szekvenciájában is, hasonlít az élesztő SNF1 protein-kináz komplexéhez (HARDIE és mtsai, 1998). A későbbiekben további  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -alegységeket izoláltak és jellemeztek. Megállapították, hogy az alegységeket 2-3 gén kódolja ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3) és így 12-féle heterotrimer komplex jöhet létre. A különböző komplexek a gének szövetspecifikus expressziója révén, különböző helyeken fordulnak elő a szervezetben, eltérőek a reakciókinetikai sajátosságaik, az AMP-vel való aktiválhatóságuk, és célfehérjéik is különbözőek (HARDIE és mtsai, 1998; HARDIE és HAWLEY, 2001).

Az élő szervezetek legfontosabb energiatároló molekulája az ATP. A különböző energiaigényes folyamatok és stresszek csökkentik az ATP-szintet, ezáltal megemelkedik az AMP-szint. Az eukarióta sejtekben az AMP, ADP, ATP energiatároló molekulák egymásba alakulása és a folyamatot katalizáló enzimeknek köszönhetően, az AMP/ATP arány az ADP/ATP arány négyzete szerint alakul. Így ez az arány nagyon jól jelzi a sejtek energiaellátottságát, amit az AMPK-k érzékelnek. Az AMP/ATP arány normális szintjének az 1:100-ról 1:25-re való növekedése elegendő az AMPK-k aktiválásához. Az aktív AMPK-k elindítják azokat a lebontó folyamatokat, pl. zsírsavlebontás, glikolízis, amelyek pótolják a hiányzó ATP-t, és inaktiválják a nagy energiaigényű felépítő folyamatokat, mint pl. szterol- és izoprén-bioszintézis, zsírsav-, koleszterin- és fehérjeszintézis (HARDIE és HAWLEY, 2001; POLGE és THOMAS, 2006).

Az élesztő SNF1 kinázához hasonlóan, az AMPK-k is foszforilációval aktiválhatók. A foszforilációt az AMP által aktivált protein-kináz-kináz (AMPKK) végzi. Az AMPK-kat a protein-foszfatáz 2C (PP2C) defoszforilációval inaktiválja (HARDIE és mtsai, 1998).

Az AMPK-k központi reguláló szerepét számos metabolikus rendellenesség, pl. cukorbetegség, elhízás, Parkinson-kór, sőt bizonyos rákbetegségek kialakulásában betöltött szerepe is bizonyítja (POLGE és THOMAS, 2006; RUBENSTEIN, 2008). Az AMPK-k szubsztrátjainak nagy része valamilyen metabolikus folyamatban vesz részt. Így, pl. a HMGR az izoprén és a koleszterol, az ACC-áz a zsírsav bioszintézis kulcsenzime. Mindkettőt foszforilációval inaktiválják az AMPK-k. Az enzimek poszttranszlációs szabályozásán túl, az AMPK-k - akárcsak az élesztőben az SNF1 - részt vesznek a génexpresszió szabályozásában is. Az AMPK-k működésének serkentése a zsírsav-szintáz és a glikolízisben részt vevő piruvát-kináz transzkripció glükóz általi indukálhatóságának elvesztéséhez vezet (FORETZ és mtsai, 1998; LECLERC és mtsai, 1998).

A legújabb adatok arra engednek következtetni, hogy az AMPK-k kihatnak az egész test energia-metabolizmusára (HARDIE és SAKAMOTO, 2006). A fizikai erőfeszítések során az AMPK-k aktiválódnak és megnövekszik az izomsejtek cukor-felvétele. Alacsony vércukor-szint esetén az AMPK-k gátolják az inzulintermelést és a β-sejtek inzulin kiválasztását. Az AMPK-kat két, az energia homeosztázist, a glucid- és a lipid-metabolizmust szabályozó adipocitaszármazék hormon, a leptin és az adinopektin is aktiválja. Az AMPK-k a glükóz-anyagcsere gátlásában is részt vesznek a májban azáltal, hogy a glikolízist és a lipogén enzimek expresszióját szabályozzák. A hipotalamuszban az AMPK-k aktivitását gátolja a glükóz, a leptin és az inzulin, vagyis azok a vegyületek, amelyek a táplálék felvételt is gátolják. Ezzel ellentétben a ghrelin, egy, a táplálék felvételt stimuláló hormon, növeli az AMPK-k aktivitását (POLGE és THOMAS, 2006).

#### 2.1.4. A növények SNF1-rokon kinázai (SnRK-k)

#### 2.1.4.1. A SnRK1 család

A SnRK fehérjék aminosav sorrendjük alapján három csoportba sorolhatók: a SnRK1, a SnRK2 és a SnRK3 családba. Az élesztő SNF1-hez és az emlős AMPK-khoz leginkább a SnRK1-ek hasonlítanak. A másik két SnRK család tagjai is megtalálhatók a legtöbb növényben, de működésük, szabályozásuk és szerepük nem annyira ismert, mint az SnRK1 család tagjaié (HALFORD és HARDIE, 1998; CRAWFORD és mtsai, 2001).

Az első SnRK1 cDNS-t ALDERSON és mtsai (1991) izolálták rizs endospermium cDNS klóntárból. Élesztő SNF1 homológokat keresve találtak rá a *RKIN1*-re, az élesztő *SNF1*-hez 48%-ban hasonló cDNS-re. Azóta számos növényből izoláltak *RKIN1*-hez hasonló cDNS-eket és genomi klónokat, pl. *Arabidopsis thaliana*-ból (*AKIN10*, LE GUEN és mtsai, 1992; *AKIN11* BHALERO és mtsai, 1999; *ATSKIN1* Acc. No.: X94755), árpából (*BKIN2*, HANNAPPEL és mtsai, 1995; *BKIN12*, HALFORD és mtsai, 1992), dohányból (*NPK5*, MURANAKA és mtsai, 1994), cukorrépából (*SBKIN154*, MONGER és mtsai, 1997), zabból (*ASPK1-3*, HUTTLY és PHILLIPS, 1995) és burgonyából (*PKIN1*, MAN és mtsai, 1997; *StubSNF1*, LAKATOS és BÁNFALVI, 1997).

A növényi SnRK1-ek - az élesztő és az állati rokonaikhoz hasonlóan - valószínűleg heterotrimer enzimkomplexként működnek. BOULY és mtsai (1999) *Arabidopsis*-ból két  $\beta$ -(AKIN $\beta$ 1 és AKIN $\beta$ 2) és egy  $\gamma$ -alegységet izoláltak, és élesztő két-hibrid rendszer segítségével kölcsönhatásukat is bizonyították. Szabályozási különbségekre utal viszont, hogy az élesztő SNF1-gyel ellentétben, az  $\alpha$  és a  $\gamma$  kölcsönhatása nem glükóz-függő.

A szekvencia és komplexképzési hasonlóságok mellett funkcionális hasonlóságok is vannak az SNF1 és az SnRK1-ek között. Élesztő mutánsokkal végzett komplementációs kísérletekből kiderült, hogy az RKIN1 (ALDERSON és mtsai, 1991), az NPK5 (MURANAKA és mtsai, 1994), és az AKIN11 (BHALERAO és mtsai, 1999) is helyettesíteni tudja az élesztő SNF1-ét. Az élesztő *∆snf4* mutáció funkcionális szupresszorainak szűrése során egy addig egyedülálló *SNF4* ortológot (*AKINβγ*) is izoláltak *Arabidopsis*-ból (KLEINOW és mtsai, 2000), amiről LUMBRERAS és mtsai (2001) kiderítették, hogy egy adaptor-regulátor kiméra molekulát kódoló gén. Az AKINβγ fehérje az N-terminálisán a β-alegységekre jellemző KIS doménnel rendelkezik, ami az  $\alpha$ -alegység kapcsolódásáért felelős, a C-terminálisán viszont a  $\gamma$ alegységekre hasonlít, amivel komplementálni is képes a  $\Delta$ Snf4 mutánst, és élesztő két-hibrid rendszerben glükóz-függő kapcsolatot mutat az AKIN11-gyel. Ortológjait kukoricában is megtalálták (ZmAKINβ $\gamma$ -1 és -2; LUMBRERAS és mtsai, 2001). De más típusú, feltehetően kéttagú komplexet is felfedeztek, melyben az AKIN11 fehérjéhez olyan kiméra molekula kapcsolódik, az AtPTPKIS1, aminek N-terminálisán egy protein tirozin-foszfatáz domén, Cterminálisán pedig a KIS domén található. Ennek homológjai szekvencia analízissel más, egy- és kétszikű növényi genomokban is megtalálhatók. Ezek a komplexképzési variációs lehetőségek az SnRK1-függő szabályozási útvonalak sokféleségét és változatos szabályozását teszik lehetővé, amire szükség is van a magasabbrendű növények esetében a helyhez kötött életmód miatt.

A növényi SnRK1-ek szabályozásáról, az élesztő SNF1-hez képest, elég keveset tudunk. Az első biokémiai vizsgálatokból kiderült, hogy a karfiol HMGR enzime foszforilációval inaktiválódik, és az ezt végző enzimet az RKIN1-specifikus ellenanyag felismeri. Bebizonyították, hogy ez az enzim egy protein-kináz kaszkád-rendszer eleme, ugyanis proteinfoszfatáz kezelésre inaktiválódik, de MgATP és tisztított emlős AMPKK fehérjefrakció hozzáadásával újra aktiválható. Vagyis, a karfiolban az SnRK1 hasonlóan szabályozódik, mint az élesztőben az SNF1, vagy az emlősökben az AMPK. Megállapították, hogy az élesztőkéhez hasonlóan, de az állatokétól eltérően, a növények SnRK1 enzimei általában nem aktiválódnak AMP hatására (MacKINTOSH és mtsai, 1992). Kivételnek számít a spenót, ahol SUGDEN és mtsai (1999b) szerint mégiscsak befolyásolja az AMP az SnRK1 aktivitását. A spenótban a tápanyaghiány vagy környezeti stressz okozta magas AMP-szint gátolja az SnRK1 aktivációs hurkában lévő treonin protein-foszfatáz 2C általi defoszforilálását, és ezáltal elősegíti az SnRK1 aktív állapotban való maradását. Ezek alapján SUGDEN és mtsai (1999b) az állati AMPK-khoz és az élesztő SNF1-hez hasonló fiziológiai szerepet tulajdonítanak az SnRK1-nek spenótban. A valóság azonban valószínűleg összetettebb. SALCHERT és mtsai (1998) és BHALERAO és mtsai (1999) azt találták, hogy a fényben nevelt Arabidopsis növényekben a szacharóz koncentráció megemelése 5 mM-ról 90 mM-ra az SnRK1 aktivitását 1.7-szeresére emeli a levelekben és 2.2-2.4-szeresére a gyökerekben. Ezzel szemben sötétben a cukorkezelés az SnRK1 aktivitást gátolta.

Az emlős HMGR foszforilálhatóságáért felelős szekvencia-motívum konzervált a növényi HMGR-ekben is. DALE és mtsai (1995) be is bizonyították, hogy a karfiol SnRK1-e foszforiláció által inaktiválja az *Arabidopsis* HMGR enzimét. Az SnRK1 célszekvencia másik

két fontos növényi bioszintetikus kulcsenzimben, a szacharóz-foszfát-szintázban (SPS-ben) és a nitrát-reduktázban (NR-ben) is megtalálható. SUGDEN és mtsai (1999a) megállapították, hogy ezek az enzimek is, a HMGR-hez hasonlóan, foszforiláció által inaktiválódnak – igaz, hogy az NR foszforilációja csak a feltehetőleg dajkafehérje funkciójú 14-3-3 fehérje jelenlétében megy végbe. A HMGR az izoprenoid (fitoszterolok, karotinoidok) bioszintézisének kulcsenzime, az SPS a szacharóz szintézis fő szabályozója a fotoszintetizáló szövetekben, az NR pedig a nitrát átalakulását katalizálja nitritté, ami nélkülözhetetlen az aminosav és más nitrogéntartalmú vegyületek szintéziséhez. Így tehát, az SnRK1-ek az NR-en keresztül regulálják az aminosav szintézist is (HALFORD és mtsai, 2004).

A növényi SnRK1-ek, hasonlóan az élesztőben és emlősökben található rokonaikhoz, a metabolikus enzimek poszttranszlációs szabályozásán kívül, részt vesznek a transzkripció szabályozásában is azáltal, hogy transzkripciós faktorokat foszforilálnak (PURCELL és mtsai, 1998). RADCHUK és mtsai (2006) SnRK1-gátolt borsón végzett microarray kísérletekkel bizonyították, hogy az SnRK1 gátlása számos más gén expressziós mintázatát is befolyásolja. A fejlődő borsóembriókban 103 gén mRNS szintje nőtt (67 ismert, 36 ismeretlen funkciójú), és 81 (59 ismert, 22 ismeretlen funkciójú) gén mRNS szintje csökkent. BAENA-GONZÁLEZ és mtsai (2007) hasonló kísérleteket végeztek *Arabidopsis* növényekkel. A kapott microarray adatok alapján az AKIN10 és AKIN11 1021 gén expresszióját befolyásolja.

*Arabidopsis*-ban a PRL1 (Pleiotrop Regulatory Locus) fehérje a glükóz- és hormonszint változásra (citokinin, etilén, abszcizinsav, auxin) adott válaszok sokaságát szabályozza (NÉMETH és mtsai, 1998). A PRL1 erősen kötődik az AKIN10, AKIN11 és az élesztő SNF1 regulációs doménjéhez élesztő két-hibrid rendszerben, ugyanoda, ahova a β-alegység is kapcsolódik. Ráadásul ez a kapcsolat nagy glükóz koncentráció esetén erősebb, mint alacsony glükóz koncentrációnál. BHALERAO és mtsai (1999) *prl1* mutáns *Arabidopsis* növényeket vizsgálva megállapították, hogy ez a mutáció *in vivo* az AKIN10 szacharózzal való indukálhatóságát nem befolyásolja, de az AKIN10 aktivitás a mutánsokban alapállapotban magasabb, vagyis a PRL1 az AKIN10 lehetséges inhibítora a fényben nevelt növényekben. A sötétben hasonló módon elvégzett kísérletek szerint, amikor a cukorkezelés az SnRK1 aktivitást gátolja, a mutáns növényekben az aktivitás alacsonyabbnak bizonyult. Vagyis, ilyenkor a PRL1 jelenléte az AKIN10-aktivitást pozitívan befolyásolja. A PRL1-AKIN10 kölcsönhatás pozitív vagy negatív irányát pedig valószínűleg egy fényfüggő faktor szabályozza (SALCHERT és mtsai, 1998).

Az AKIN10 és AKIN11 a proteoszómás fehérje lebontás egyes faktoraival is kapcsolatban áll. A faktorok egyike az SKP1/ASK1 fehérje, ami a konzervált SCF ubiquitinligáz komplex egyik alegysége, és az úgynevezett F-box szekvenciákat hordozó szubsztrátokat köti. Ezeket az F-box szekvenciákat tartalmazó fehérjéket az AKIN-ek valószínűleg foszforilálják, amelyek ezután feltehetően ubiquitinálódnak és lebomlanak. Az SKP1/ASK1 ugyanott kötődik az AKIN-ekhez, mint az előbb tárgyalt PRL1 és  $\beta$ -alegységek. Az SKP1/ASK1-AKIN kölcsönhatást a PRL1 jelenléte gyengíti. De az AKIN-ek ugyanezen helyére kötődik a proteaszóma  $\alpha$ 4-es alegysége is. Ez azonban az SKP1/ASK1-AKIN10/AKIN11 komplex létrejöttét nem gyengíti, hanem ellenkezőleg, erősíti és a 26S proteoszómákhoz köti. Az SKP1/ASK1 valamint a proteoszomális  $\alpha$ -alegységek a sejtmagban találhatók, sejtosztódáskor azonban a mitotikus orsókhoz és fragmoplasztokhoz kapcsolódnak. A mitotikus orsó egy lehetséges szubsztrátja az SCF-proteoszómális komplexnek, így valószínűsíthető, hogy a SnRK1-ek beleszólnak a sejtciklus szabályozásába is (FARRÁS és mtsai, 2001).

HAO és mtsai (2003) úgy találták, hogy az SnRK1-ek által szabályozott metabolikus útvonalak a növények vírusok elleni védekezésében is szerepet játszanak (bővebben a 2.3.2.2 fejezetben). Dohány növényekkel végzett kísérletekből kiderült, hogy a GAL83 ortológjának gátlása a szén allokációját negatívan befolyásolja a levélkártevők által fertőzött növényekben, illetve a szeneszcencia előrehaladásakor, amikor a szénforrások gyors és megfelelő mobilizására lenne szükség. Ezen kívül azt is megfigyelték, hogy az antiszensz GAL83-as dohány növények a nagyobb virágszám ellenére kevesebb egészséges magot hoznak (SCHWACHTJE és mtsai, 2006).

Az SnRK1 komplexek növényen belüli lokalizációjára az alegységek sejt-, illetve szövetspecifikus expressziós mintázatából következtethetünk. HALFORD és HARDIE (1998) szerint az SnRK1a alcsaládba tartozó  $\alpha$ -alegységek az egész növényben alacsony szinten és konstitutívan fejeződnek ki. PIEN és mtsai (2001) szerint viszont a paradicsom hajtáscsúcsában a *LeSNF1* expressziós mintázata, a szénhidrát metabolizmus változásával összhangban, sejttípusonként változik. A *LeSNF1* transzkriptum az aktívan osztódó merisztéma sejtekben nem, de a már kialakult levél primordiumban detektálható volt. A többi növényi  $\beta$ -,  $\beta\gamma$ -,  $\gamma$ - alegységekről is ismert, hogy mely szövetekben, szervekben expresszálódnak inkább. Vannak, amelyek a reproduktív és vannak, amelyek a vegetatív szervekben expresszálódnak jobban, és mindezt különböző környezeti hatások (fény, sötét, stb.) befolyásolják (LUMBRERAS és mtsai, 2001; BOULY és mtsai, 1999; LAKATOS és mtsai, 1999). Ugyanakkor különböző növényi hormonok, pl. az abszcizinsav és a gibberellinsav is befolyásolják egyes alegységek expresszióját (BRADFORD és mtsai, 2003). Az alegységek expressziós különbségei és az egymáshoz való affinitásbeli különbségek hozzájárulnak az SnRK1 komplexek működésének és szervezeten belüli elhelyezkedésének szabályozásához.

#### 2.1.4.2. A burgonya SnRK1-ei

A burgonyából eddig két SnRK1 családba tartozó kináz cDNS-ét izolálták: a *PKIN1*-et MAN és mtsai (1997), és a *StubSNF1*-et LAKATOS és BÁNFALVI (1997). A StubSNF1 fehérjéről élesztő két-hibrid rendszer segítségével kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép az élesztő GAL83 fehérjéjéhez hasonló burgonya fehérjével, amit a jelentős hasonlóság miatt StubGAL83-nak neveztek el. A StubGAL83 aminosav szekvencia elemzéséből tudjuk, hogy a fehérje tartalmazza az ASC domént, ami a γ-alegység kapcsolódásáért felelős, sőt élesztő két-hibrid rendszerben a StubGAL83 interakcióba lép az élesztő SNF4 fehérjéjével (LAKATOS és mtsai, 1999). Eddig azonban még nem sikerült izolálni az *SNF4* ortológját burgonyából, pedig igen valószínű, hogy a StubSNF1 enzim komplexet is három különböző fehérje alkotja. A másik burgonya SnRK1, a PKIN1, nem lép kölcsönhatásba a StubGAL83-mal élesztő két-hibrid rendszerben, és más kölcsönható partnerét sem izolálták még. A két burgonya *SnRK1* gén 5' végi katalitikus doménje 89%-ban, míg a 3' végi regulátor doménje csak 60%-ban hasonlít egymáshoz. Két-hibrid vizsgálatokból azonban tudjuk, hogy nem a szekvencia különbség az oka, hogy a PKIN1 és a StubGAL83 között nem jön létre kapcsolat. Ennek oka feltehetően a PKIN1 térbeli szerkezetében keresendő (LOVAS és mtsai, 2003).

A *StubSNF1* és a *PKIN1* gének az egész növényben alacsony szinten és konstitutív módon fejeződnek ki (HALFORD és HARDIE, 1998), azzal a kiegészítéssel, hogy a *StubSNF1*-nek a virágban (LAKATOS és mtsai 1999), a *PKIN1*-nek pedig az *in vivo* sztólóban egy kicsit erősebb az expressziója, mint más szervekben (MAN és mtsai, 1997). Ezt az expressziós mintázatot nem befolyásolják a különböző környezeti hatások (fény, sötét, növényi hormonok, cukrok). A *StubGAL83* a növény minden szervében erősebben nyilvánul meg, mint az *SnRK1*-ek. Legerősebben a levélben, a szárban és a virágban, leggyengébben a gyökérben és a bogyóban íródik át (LAKATOS és mtsai, 1999; LOVAS, 2003). A fiatal levelekben több transzkriptum van, a levelek elöregedésével a *StubGAL83* mRNS mennyisége csökken. Levélben az expresszió erőssége fényfüggő, sötétben lényegesen magasabb, mint folyamatos megvilágítás mellett. A *StubGAL83* transzkripcióját a növényi hormonokkal való kezelés és fényben a cukorkezelés nem befolyásolja. A metabolizálható cukrokkal (glükóz, szacharóz, galaktóz) való kezelés azonban csökkenti a transzkripció sötéttel való indukálhatóságát, vagyis valószínűleg a fotoszintézis termékeinek a hiánya (metabolitszintek változása) és nem a sötétség fokozza a transzkripciót (LOVAS, 2003).

Az élesztő Snf1, Snf4, és Sip1,Sip2,Gal83 mutánsokkal végzett komplementációs kísérletek eredménye azt mutatja, hogy a *StubSNF1* teljesen komplementálja a  $\Delta snf1$  mutációt, a  $\Delta snf4$  mutációt pedig részlegesen, a *PKIN1* viszont minderre még részlegesen sem képes. A

 $\Delta$ sip1, $\Delta$ sip2, $\Delta$ gal83 mutáns fenotípust a StubSNF1 önmagában részlegesen, a StubGAL83-mal együtt tökéletesen képes helyreállítani, míg a StubGAL83 önmagában nem képes komplementációra. A PKIN1 sem önállóan, sem a StubGAL83-mal együtt nem tudja ezt a hibát kijavítani. Mindez arra utal, hogy funkcióbeli különbség van a burgonya két SnRK1 fehérjéje között (LOVAS és mtsai, 2003).

A burgonya *StubGAL83* génjének antiszensz gátlása gyökér és gumófejlődési zavarokhoz vezet, valamint fokozza a növények sóérzékenységét. Ezen túlmenően, az antiszensz növényekben megnövekszik egyes, az oxidatív stressz hatására keletkező anyagcseretermékek, a Szentgyörgyi-Krebs- és glioxalát-ciklusban résztvevő metabolitok, valamint a fehérjelebontás köztes termékének számító glutaminsav mennyisége. Vagyis, mintha a növény folyamatos oxidatív stresszben lenne, és az energiatermelő (Szentgyörgyi-Krebs-ciklus), illetve egyes makromolekulák lebontását végző folyamatok (glioxalát-ciklus) intenzívebbekké válnának. Az elhaló sejtekben zajló fehérjelebontás értékes anyagait, pl. glutaminsav (könnyen transzportálható aminosav) formájában tudja kivonni a növény. Vagyis, a fehérjelebontás fokozódásának lehetünk tanúi ezekben a növényekben (LOVAS, 2003). Ez összhangban van az *Arabidopsis*-szal végzett kísérletek eredményével (FARRÁS és mtsai, 2001), ami azt mutatta, hogy egy β-alegység kompetítor a fehérje degradációban való részvételre csábítja az AKIN komplexet.

A burgonya *StubSNF1* és *PKIN1* génjeinek antiszensz gátlását és annak fenotípusos vizsgálatát is elvégezte munkacsoportunk (LOVAS, 2003). Az antiszensz *PKIN1* növényeknél semmilyen növekedésbeli vagy gyökerezésbeli rendellenesség nem volt tapasztalható, míg az antiszensz *StubSNF1* és azon antiszensz növények, amelyekben mindkét *SnRK1* gén csendesítve volt, lemaradtak növekedésben a vad típushoz képest. Hasonló lemaradást lehetett tapasztalni a gyökereztetési tesztekben is, ami sóval kiegészített táptalajon még erőteljesebb volt. PURCELL és mtsai (1998) szerint a *PKIN1* antiszensz gátlása a szacharóz-metabolizáló enzimet kódoló gén, a szacharóz-szintáz (*Susy1*) expressziójának csökkenését okozza minigumókban. Ezt munkacsoportunk egyik antiszensz vonalnál sem tapasztalta. Az ellentmondás oka lehet az antiszensz gátlás módjának (más promóter, más génszakasz) eltérése, illetve az a tény, hogy a *Susy1* expresszióját több faktor is befolyásolja (LOVAS, 2003).

McKIBBIN és mtsai (2006) szerint a burgonya *PKIN1* génjének gumóspecifikus patatin promóterrel történő túlexpresszáltatása a glükóz koncentráció 17-56%-os csökkenését és a keményítő tartalom 23-30%-os emelkedését eredményezi a transzgénikus növények gumójában a nem-transzformált kontrollhoz képest. Ugyanakkor a szacharóz és a fruktóz mennyisége nem változik szignifikánsan a gumókban. A keményítő bioszintézis két kulcsenzimét, az szacharózszintázt és az ADP-glükóz pirofoszforilázt kódoló *SusyI* és *AGP-áz* gének expressziója - a northern vizsgálatok tanúsága szerint - emelkedik, amit az enzimaktivitás értékek jelentős emelkedése is követ.

#### 2.2. A piruvát-kináz szerepe a növényekben

#### 2.2.1. A növények légzése

A légzés azoknak a folyamatoknak az összessége, amelyek során a szerves anyag egyszerűbb vegyületekké oxidálódik. Ez a folyamat energia-felszabadulással jár, aminek egy része kémiai formában, nagy energiatartalmú foszfátkötések (ATP) szintézise révén konzerválódik. (FARKAS, 1984). Az összetettebb szénhidrátok lebomlása során valamely monoszacharid vagy annak foszforilált formája keletezik. Amennyiben nem foszforilált monoszacharid a bontás végterméke, a cukrok az ATP és valamilyen kináz segítségével foszforilálódnak, mielőtt ténylegesen eloxidálható vegyületekké átalakulnának. A biológiai oxidáció első egysége tulajdonképpen a glikolízis, amit Embden-Meyerhof-Parnas útnak is neveznek. Ebben a szakaszban történik a hexózok lebontása piroszőlősavvá (piruváttá).

A glikolízisnek három szakasza van (1. ábra):

- 1. A hexózok aktiválása: energia befektetéssel (pl. ATP felhasználással) hexózfoszfátok, illetve hexóz-biszfoszfátok jönnek létre.
- A 6 szénatomos szénlánc bomlása 2 db triózfoszfáttá (glicerinaldehid-3-foszfát, G-3-P; dihidroxi-aceton-foszfát, DHAP)
- 3. oxidációs folyamatok:
  - a. a G-3-P oxidációja 3-foszfo-glicerinsavvá (3-PGS) ATP és NADH képződése mellett
  - b. a 3-PGS átalakulása piroszőlősavvá ATP képződése mellett.



1. ábra A glikolízis

A továbbiakban a glikolízisben keletkező piroszőlősav a mitokondriumba transzlokálódik és aerob körülmények között tovább oxidálódik a Szent-Györgyi-Krebs ciklusban (citrát kör, trikarbonsav ciklus; 2. ábra). Alternatív út lehet, ha a foszfoenol-piruvátból (PEP) oxálecetsavon keresztül almasav lesz, ami szintén képes a mitokondriumba bejutni és ott a citrát kört táplálni. A piruvát oxidációjának jelentősége kettős. A ciklusban keletkezik számos

olyan vegyület (intermedier), ami, mint szénváz, nélkülözhetetlen a különböző bioszintetikus folyamatokhoz (aminosav-, zsír-, fehérjeszintézis). Ezen kívül, a piroszőlősav oxidációja során jön létre annak a NADPH<sub>2</sub>-nek és FADH<sub>2</sub>-nek a jelentős része is, ami a terminális oxidáció szubsztrátja, és aminek oxidációjához kapcsolódik a sejt nem-fotoszintetikus ATP-szintézisének a zöme (FARKAS, 1984).



#### 2. ábra A Szent-Györgyi-Krebs ciklus

#### 2.2.2. A piruvát-kináz (PK)

A PK a glikolízis utolsó lépését katalizálja, amiben PEP-ből piruvát keletkezik, miközben egy ADP molekulából ATP lesz. A PK segítségével keletkező piruvát szükséges a Szent-Györgyi-Krebs ciklus zavartalan működéséhez. A reakció irreverzibilis, és feltehetőleg a glikolízis és a respiráció szabályozásának általános regulációs pontja, ahogy azt több biokémiai tanulmány is jelzi, mind mikrobiális (TEUSINK és mtsai, 2000), mind állati (PILKIS és GRANNER, 1992) és növényi rendszerekben (THOMAS és mtsai, 1997; GEIGENBERGER és mtsai, 1998; SCHWENDER és mtsai, 2004; PLAXTON és PODESTÁ, 2006). A nem növényi szervezetekkel ellentétben a növényekben nemcsak a citoszólban (PK<sub>c</sub>), hanem a plasztiszokban (PK<sub>p</sub>) is van PK (PLAXTON, 1996; GIVAN, 1999), sőt, legújabban BARI és mtsai (2007) a jeruzsálemi articsóka mitokondriumaiból (PK<sub>m</sub>) is kimutatták.

A PK<sub>c</sub> és a PK<sub>p</sub> feltűnően különböznek egymástól fizikai, immunológiai és kinetikai/szabályozási tulajdonságaikban (PLAXTON 1989; 1996; PLAXTON és mtsai, 1990; 2002). A PK<sub>c</sub>-nek szövetspecifikus izozimjei is vannak, amelyek lényeges különbségeket mutatnak a megfelelő fizikai és/vagy kinetikai és szabályozási tulajdonságaikban (TURNER és mtsai, 2005; PLAXTON és PODESTÁ, 2006). Feltételezik, hogy a PK<sub>c</sub> izozimek allosztérikus visszacsatolási szabályozása különböző metabolit effektorokon keresztül történik, és ezek modulálják - a Szent-Györgyi-Krebs ciklus, illetve a légzési végtermékek által meghatározott pillanatnyi igényeknek megfelelően - az in vivo aktivitást. Ilyen allosztérikus szabályozók lehetnek az ATP és/vagy a bioszintetikus prekurzorként szolgáló szénvázas vegyületek (KOBR és BEEVERS, 1971; PODESTÁ és PLAXTON, 1991). A tisztított PKc gátolható glutamáttal, ami visszafordítható aszpartáttal. Ennek akkor van jelentősége, amikor az NH4<sup>+</sup>-asszimiláció mértéke megnő (HU és PLAXTON, 1996; SMITH és mtsai, 2000a; TURNER és PLAXTON, 2000). A PK<sub>c</sub> aktivitását a citoplazma pH-változásai is befolyásolják (PODESTÁ és PLAXTON, 1991; 1992; 1994; TURNER és mtsai, 2005). A PKc aktivitásra gátló hatással van az ATP (PODESTÁ és PLAXTON, 1991; 1992; 1993). A PKc azonban nemcsak allosztérikusan szabályozódik. TANG és mtsai (2003a) megállapították, hogy a PKc poszttranszlációsan is szabályozódik, mégpedig két úton. Az egyik egy foszforilációs lépéssel kezdődik, ami ubiquitinkötődés után proteoszómás lebontásban végződik. A másik út egy körülbelül 4 kDa nagyságú rész levágódásával jár, ami egy stabilabb, aktív formát eredményez.

*Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy a PK<sub>p</sub> nélkülözhetetlen a zsírsavszintézis normális működéséhez (ANDRE és BENNING, 2007; ANDRE és mtsai, 2007; BAUD és mtsai, 2007). A PK<sub>c</sub> viszont a növények normális növekedéséhez szükséges. Gátlása esetén, pl. a dohány kisebbre nő, valószínűleg a megváltozott "sink-source" metabolizmus miatt (GATTLOB és mtsai, 1992; KNOWELS és mtsai, 1998; GRODZINSKI és mtsai, 1999). Arról azonban még csak egy publikáció született, hogy a növények heterotróf szöveteiben (gyökér, gumó) a megváltozott PK<sub>c</sub> milyen hatással van a metabolizmusra. OLIVER és mtsai (2008) antiszensz technikával gátolták a PKc-t gumóspecifikus promóter segítségével. A gátlás olyan jól sikerült, hogy a PK<sub>c</sub> transzkriptum szintje csak 1-3%-a volt a vad típusban mérhetőnek. A PK<sub>c</sub> gátlása a PEP/piruvát arány megemelkedéséhez vezetett, de ez csak a piruvát csökkenésének volt köszönhető, a PEP mennyisége nem változott szignifikánsan. A piruvát mennyiségi csökkenése mellett több, a Szent-Györgyi-Krebs ciklusban szereplő szerves sav mennyisége is csökkent, és egy aminosavé, az aszparaginé is. Két aminosav mennyisége viszont megnőtt (lizin, alanin). Csökkent a gumók össz-fehérje tartalma, de szignifikánsan növekedett a gumók száma. A gumók össz-tömege azonban csak egy vonalban mutatott szignifikánsan nagyobb értéket, és a respirációs ráta, valamint a Szent-Györgyi-Krebs ciklus intenzitása is csak egy transzgénikus vonal esetében változott. Ez ellentmond annak a korábbi feltételezésnek, hogy a PK<sub>c</sub> a respiráció szabályozásának egyik eleme lenne. Az összes oxigén felhasználás (respirációs ráta) nem változott ugyan, de az alternatív-oxidáz (AOX) irányította mitokondriális elektrontranszport alternatív útvonala erősen gátlódott, ami még piruvát adással sem állt tökéletesen helyre, az AOX transzkriptum és protein lényegesen alacsonyabb szintje miatt (OLIVER és mtsai, 2008).

A növényi PK-ok meglepő biokémiai komplexitását a genomszekvenálás eredményei is alátámasztották. *Arabidopsis*-ból 15, rizsből 8 *PK* gént azonosítottak (MARCHLER-BAUER és mtsai, 2002; ANDRE és mtsai, 2007). Burgonyában OLIVER és mtsai (2008) az eddig ismert egy PK mellé további nyolc izoformát találtak. Ezek közül ötöt citoszólikus és négyet plasztisz PK-nak írtak le. Az öt PK<sub>c</sub> mérete a szekvencia adatok alapján 54-57 kDa között van. Western blot analízissel három különböző méretű peptidet kaptak, kb. 50, 55 és 60 kDa tartományban. Feltételezik, hogy a kb. 50 kDa protein poszttranszlációs hasítás terméke, hasonlóan ahhoz, ahogy TANG és mtsai (2003a) azt a szójában találták.

#### 2.3. Növényi vírusok és a növények vírusfertőzésre adott válaszai

#### 2.3.1. Növényi vírusok

A vírusok fertőző nukleoproteidek, járványszerű betegségek kialakítására képesek, az ehhez szükséges genetikai információ a köpenyfehérjével burkolt nukleinsav. A nyugalomban lévő, fehérjeburokkal borított, szabályos szerkezetű vírusrészecskéket virionoknak, a sejtben

sokszorozódó nukleinsavakat vegetatív vírusnak nevezzük. A virionok két alapvető részből állnak, a nukleinsavból és a köpenyfehérjéből. Egyes virionokat glikoprotein vagy foszfolipid burok vehet körül. A nukleinsav lehet egyszálú vagy kétszálú dezoxiribonukleinsav (DNS) vagy ribonukleinsav (RNS). Amennyiben a nukleinsav egyszálú RNS, akkor beszélünk negatív, pozitív, vagy amfiploid (részben negatív, részben pozitív polaritású) RNS vírusról. Amennyiben pozitív, akkor mRNS-ként viselkedik, tehát róla közvetlenül transzláció valósul meg. A nukleinsav lehet egykomponensű és többkomponensű, lineáris vagy kör alakú. A virionok felépítése lehet helikális, ilyenkor pálcika, vagy fonál alakú, vagy izometrikus, amikor szabályos, kristályszerű szerkezetet mutatnak. A növénypatogén vírusok az egész Földön elterjedtek, jelentős gazdasági kárt okoznak (a termésveszteség 10%-a). Túlnyomó többségük (kb. 75%) egyszálú pozitív RNS vírus. A *Potyvirus*-ok a gazdaságilag legjelentősebb víruscsoport, képviselői a növénytermesztés összes ágában problémákat okoznak (GÁBORJÁNYI, 1998, 1999).

A burgonya Y vírus (potato virus Y, PVY) a Potyvirus nemzetség típusfaja. Legfontosabb gazdanövényei a Solanaceae családba tartoznak: a burgonya, a paradicsom, a paprika és a dohány. A vírus az egész világon elterjedt, és mivel tömegtermelésbe vont növényeket fertőz, gazdasági jelentősége nagy. Széleskörű elterjedéséből adódik, hogy számos eltérő izolátuma van, amelyek mind a gazdanövényeken okozott tüneteik, mind szerológiai tulajdonságaikban és levéltetű-átviteli képességükben különböznek, s egyben ez a hagyományos csoportosításuk alapja is (DE BOKX és HUTTINGA, 1981). A burgonyáról izolált PVY törzseket három fő csoportba osztották. Először az "O" törzs volt a legelterjedtebb (SIEGVALD, 1984), majd a Magyarországon először Szirmai János által leirt, a dohányon érnekrózist okozó "N" törzs (SZIRMAI, 1958). A felosztás szerint a harmadik csoport a "C" törzs, ezek az izolátumok nem vihetők át levéltetűvel. Magyarországon jelentős, a világon elsőként nálunk izolált és jellemzett "NTN" törzs az előzőektől eltérően, burgonyagumón nekrotikus gyűrűs foltosságot okoz (BECZNER és mtsai, 1984). A PVY virionjai kb. 700 nm hosszúságúak, fonál alakúak, hajlékonyak. Egyetlen pozitív egyszálú RNS láncot tartalmaznak, amelynek hossza 9702 nukleotid. A genom egyetlen nyílt leolvasási keret, ennek megfelelően egy poliprotein képződik, amit a vírus által kódolt három proteináz vág fel tíz funkcionális fehérjére. Ezek közt van a vírusátvitelben is szerepet játszó, segítő fehérje (helper component, HcPro) és a köpenyfehérje (coat protein, CP).

#### 2.3.2. A növények vírusfertőzésre adott válaszai

A fertőzött növényekben szembetűnő változások játszódnak le, amelyek egy része a betegség tünetei, más részük a kórokozó elleni védekezés elemei. A különböző jelenségek okai még nem minden esetben tisztázottak. A kórokozóval fertőzött növény legáltalánosabb válasza a légzésintenzitás növekedése, amelynek jellemző vonása, hogy az alternatív légzési anyagcsere utak, mint a pentózfoszfát út és a különleges oxidázok jelentősége megnő. A másik jellemző jelenség a nukleinsav- és a fehérje-anyagcsere megváltozása, ami egyrészről a kórokozó saját anyagainak szintézise és az ehhez szükséges növényi erőforrások elszívása miatt van, másrészről a növények egyik legfontosabb védekezési mechanizmusának a része (BARNA, 1998).

#### 2.3.2.1. Géncsendesítés

A növényeknek igen sokféle környezeti hatás ellen kell védekezniük, amit még nehezít is a helyhez kötött életmódjuk. Védekezési mechanizmusaik éppen ezért rendkívül sokfélék. A vírusok ellen is többféle stratégiájuk van, és ezeket a különböző válaszlépéseket általában kombinálva vetik be vírusfertőzés esetén. A válaszlehetőségek egyik igen fontos eleme a génátíródás utáni géncsendesítés, a "post-transcriptional gene silencing" (PTGS).

A PTGS felfedezéséhez az a kísérlet vezetett, amelyben a petúnia lila színét szerették volna sötétíteni, de egyes növényeknél éppen az ellenkezőjét érték el, vagyis a lila színért felelős salkon-szintáz szensz expresszáltatása átmenetileg megemelte ugyan az mRNS-szintet, de az szekvencia-specifikusan le is bomlott (NAPOLI és mtsai, 1990). Később kiderült, hogy ha vírus szekvenciákkal transzformálnak növényeket, akkor az sok esetben elveszti fogékonyságát az adott vírussal szemben, vagy fogékony marad ugyan, de kigyógyul a betegségből (SWANEY és mtsai, 1995). A vírusfertőzésből kigyógyulni képes növényeket vizsgálva kiderült, hogy ezekben a növényekben a vírus-RNS specifikus lebomlása játszódik le. Azóta már azonosították a jelenséget *Caenorhabditis elegans*-ban, gombában (*Neurospora crassa*), *Drosophila*-ban, egérben, sőt differenciálódott emlőssejt kultúrákban is. Mindezek alapján valószínű, hogy már az evolúció korai szakaszában kialakult ez a mechanizmus (HUTVÁGNER és ZAMORE, 2002). Sőt, már az is bizonyított, hogy ez a mechanizmus nemcsak a vírusok elleni védekezésben, hanem, az egyedfejlődés során, a génexpresszió poszttranszkripciós szabályozásában is szerepet játszik (LLAVE és mtsai, 2002; EAMENS és mtsai, 2008).

A PTGS működésének (3. ábra) alapja, hogy ha az eukarióta sejtek kettősszálú RNS-t észlelnek magukban, akkor azt lebontják és lebontják a saját mRNS-eiket is, amelyeknek közös szekvenciájuk van a kettősszálúakkal. Ezt a jelenséget RNS interferenciának is nevezzük. A folyamatot a hosszú duplaszálú RNS molekulák 20-25 nukleotid hosszúságú fragmentumokra történő hasítása indítja be. Ezek az RNS-ek, amelyeket kis interferáló RNS-eknek (small interfering RNA, siRNS) neveznek, beépülnek egy fehérje komplexbe, ahol ATP-függő kicsavarodásuk konformáció változást idéz elő, és így egy aktív, RNS-indukálta, RNS-hasító komplex jön létre (**R**NA-**i**nduced **s**ilencing **c**omplex, RISC). A következő lépésben, ami már kevés, vagy semennyi ATP-t sem igényel, a RISC felismeri és hasít minden olyan RNS-t, ami komplementer a siRNS szálaival (HUTVÁGNER és ZAMORE, 2002).

A siRNS-ek előállításáért a Dicer nevű enzimcsalád a felelős. A Dicerek a duplaszálú RNS-specifikus endonukleázok RNaseIII családjának tagjai. Mint a többi RNaseIII enzim termékének, a siRNS-eknek is van 5'-foszfát és 3'-hidroxil végük, és két párosítatlan nukleotidjuk a 3' végükön (BASS, 2000). Ezek a szerkezeti elemek fontosak ahhoz, hogy a siRNS-ek hatékonyan részt vehessenek az RNS-ek lebontásában. A siRNS-ek hossza faj-specifikus és tükrözi a Dicer homológok RNaseIII doménjeinek struktúrájában lévő különbségeket. Az RNaseIII enzimek közül a Dicer különleges abban a tekintetben, hogy a hasítás ATP-t igényel. A Dicer enzimek nagy, sok doménű fehérjék, melyek a helikázon kívül tartalmaznak még két tandem ribonukleázt (RNaseIII) és egy vagy két dsRNS-kötő domént. Az ismétlődő RNaseIII domén felelős a dsRNS endonukleotikus hasításáért siRNS-ekké (TANG és mtsai, 2003b).

A Dicerrel ellentétben a RISC komplex kialakulása nem ATP igényes. A biokémiai vizsgálatok alapján az aktív RISC egyszálú siRNS-t és egy fehérje ribonukleázt tartalmaz. A RISC ribonukleáz doménjét Slicer-nek nevezték el, mivel működésében jellegzetesen eltér a Dicer-től. A kísérletek azt mutatták, hogy a RISC a cél RNS-en a siRNS-sel homológ szekvencia közepén hasít (HUTVÁGNER és ZAMORE, 2002). Egyes élőlényekben a Dicer-en és a RISC-en kívül RNS-függő RNS-polimeráz (**R**NA-**d**ependent **R**NA-**p**olymerase, RdRP) aktivitásra is szükség lehet, ami az aberráns vagy idegen egyszálú RNS komplementer szálának szintetizálását végzi (CELOTTO és GRAVELEY, 2002; CHIU és RANA, 2002). DALMAY és munkatársai (2000) szerint növényekben a transzgén által indukált PTGS-hez szintén szükség van az RdRP-re, de a vírus által indukált géncsendesítésnél (VIGS) ez nem játszik szerepet. AHLQUIST (2002) szerint a PTGS-t a vírusreplikáció során keletkező duplaszálú (ds)-RNS, vagy egy növényi RdRP aktivitása váltja ki.



3. ábra A PTGS modellje (HUTVÁGNER és ZAMORE, 2002)

A PTGS egy természetes védekezési mechanizmus, ami mesterségesen is előidézhető olyan transzgének expresszáltatásával, amelyek komplementerek a vírus-szekvenciákkal, és így vírus-rezisztencia indukálható (VANITHARANI és mtsai, 2005). Mindez előidézhető a vírus-szekvencia szensz, antiszensz, vagy szensz és antiszensz (un. "hajtű"- (hairpin-) RNS expresszáltatásával. SMITH és mtsai (2000b) megfigyelték, hogy a hajtű, vagy önkiegészítő (self-complemeter) RNS technika lényegesen hatékonyabb, mint a másik két megközelítés. Hasonló eredményre jutottak WESLEY és mtsai (2001) is. A PTGS-alapú rezisztencia-stratégia potenciálisan kisebb veszélyt jelent a növény fejlődésére, mint azok, amelyeknél transzgén-eredetű fehérje is képződik, bár ezt teljes bizonyossággal csak akkor jelenthetjük ki, ha a teljes növényi genom szekvenciáját megismerjük (SHEPHERD és mtsai, 2009).

Ha a PTGS a gazdanövény egyik védekezési módja a vírusok ellen, akkor feltételezhető, hogy bizonyos "sikeres" vírusok már válaszlépésekre is képesek. GFP-vel (green fluorescence protein) transzformált dohány növényekben PTGS-sel inaktiválták a GFP megnyilvánulását, majd vírusokkal fertőzték a növényeket. A feltételezés az volt, hogy ha a vírus szuppresszálni képes a PTGS-t, akkor a növény újra "világítani" fog. A kísérlet során a burgonya Y vírussal fertőzött növények újra világítottak, míg a burgonya X vírussal fertőzöttek nem. Ebből arra következtettek, hogy egyes növényi vírusokban van PTGS-szuppresszor, másokban viszont nincs. Mivel azonban ezek a vírusok is sikeresek a növények megfertőzésében, feltételezhető, hogy a PTGS szuppresszión kívül más ellenstratégia is kifejlődött a vírusokban a növényi PTGS leküzdésére (LI és DING, 2001). A PTGS-szuppresszió jelenségét számos vírus esetében megfigyelték, és azonosították az ezért felelős gént is. VOINNET és mtsai (1999) az alfamo-, como-, cucumo-, gemini-, nepo-, potex-, poty-, sobemo-, tobamo-, tobra-, tombusvírusok csoportjába tartozó egy vagy több vírust vizsgáltak a PTGS-szuppresszió szempontjából. Megállapították, hogy a szuppresszió mértéke és térbeli mintázata nagy változatosságot mutat. Például, volt olyan vírus, amelyik minden fertőzött levélben és szövetben, míg mások csupán a legfiatalabb levelek ereiben szuppresszálták a PTGS-t. Ez a változatosság ugyanazon víruscsoport (potexvírus) egymással szoros rokonságban lévő tagjai között is fennállt. Összességében arra a következtetésre jutottak, hogy különböző vírusok a gazdanövény PTGS folyamatát eltérő stratégiával, különböző pontokon támadják. Ez a gazdanövény és a vírusok dinamikus koevolúciójára utal a géncsendesítési mechanizmussal kapcsolatban.

#### 2.3.2.2. Anyagcsere módosítás

SUNTER és mtsai (2001) két geminivírus, a paradicsom arany mozaik vírus (tomato golden mosaic virus; TGMV) AL2 génjét és a répa csúcs-göndörödés vírus (beet curly top virus; BCTV) L2 génjét vizsgálva megállapították, hogy mindkettőnek köze van a virulenciához. Az AL2 gén egy transzkripciós aktivátor proteint (TrAP) kódol, ami a vírus köpenyfehérjéjének hatékony termelődéséhez szükséges, valamint a BR1 gén aktivátora, ami a növényen belüli terjedésért felelős úgynevezett "movement protein"-t kódolja. A L2 gén az AL2 pozícionális homológja, de az általa kódolt fehérje alig mutat hasonlóságot a TrAP proteinnel. Hiányzik róla a transzkripciós aktivátor domén, nem szükséges a köpenyfehérje termelődéséhez, és hiányában is képes a vírus a növényt szisztemikusan fertőzni. Tehát, a genomban elfoglalt hasonló pozíció nem párosul hasonló szereppel a transzkripció szabályozásában. Az L2 mutáns vírusokkal fertőzött növények nagyobb gyakorisággal képesek kigyógyulni a betegségből, de ez a képesség függ a fertőzési és a növekedési körülményektől is. A L2-transzgénikus és az olyan AL2-vel transzformált dohány növények, amelyekben hiányzik a TrAP aktív doménje, fogékonyabbak a vírusfertőzésekre, nemcsak a TGMV és a BCTV, hanem a dohány mozaik vírussal (tobacco mosaic virus, TMV) történő fertőzésre is. Ez azért különös, mert a TMV, a másik kettővel ellentétben, amelyek egyszálú DNS-vírusok, egy RNS-vírus. Vagyis, mind az AL2 mind az L2 képes csökkenteni a gazdanövény általános stressz, illetve vírusfertőzésekre adott válaszlépéseinek hatékonyságát.

Az a tény pedig, hogy nem szükséges a TrAP transzkripciót aktiváló funkciója, azt jelenti, hogy az eddig ismert mellett van legalább még egy ismeretlen funkciója is.

Élesztő két-hibrid rendszer segítségével két fehérjét találtak az Arabidopsis cDNS klóntárban, amelyek kölcsönhatásba lépnek az AL2 és L2 fehérjékkel. Az egyik egy adenosinkinase (ADK), a másik pedig egy SnRK1, az AKIN11 volt. Az interakció részletes vizsgálata során mindkét vírusfehérjén egy 13 aminosavból álló szakaszra lokalizálták a SNF1 kapcsolatért felelős régiót. Miután egyik fehérjén sincs SnRK1 foszforilációs motívum, kizárhatjuk, hogy kináz-szubsztrát kapcsolatról lenne szó. A további vizsgálatok során megállapították, hogy a SNF1 antiszensz gátlása dohány növényekben ugyanolyan megnövekedett fogékonyságot eredményez a vírusfertőzésekre, mint az AL2 vagy L2 termeltetése. A nagyobb fogékonyság a lappangási idő rövidülésében, és a fertőzéshez szükséges vírusinokulum koncentrációjának csökkenésében nyilvánult meg, azonban nem okozta sem a fertőzés tüneteinek erősödését, sem megváltozását, sem a víruskoncentráció emelkedését a megfertőzött szövetekben. Ugyanakkor a SNF1 konstitutív szensz expresszáltatása megnövekedett rezisztenciához vezetett: nagyobb vírusinokulum koncentráció volt szükséges a fertőzés kialakításához, de a betegség lefolyásában nem volt különbség a vad típushoz képest. Megállapították továbbá azt is, hogy in vitro mindkét fehérje, sőt az L2 élesztőben in vivo is, gátolja a SNF1 aktivitást. Az AL2 hatását nem tudták vizsgálni in vivo, mert expressziója erősen csökkenti az élesztő növekedési rátáját (HAO és mtsai, 2003).

Abból a felismerésből, hogy a SNF1 expressziójának megváltoztatása módosítja a vírusfertőzésre való fogékonyságot, HAO és mtsai (2003) arra a következtetésre jutottak, hogy a gazdának "veleszületett" fontos tulajdonsága, hogy a vírusfertőzésre anyagcsere változtatással reagál. Az a megfigyelésük, hogy a geminivírusok AL2 és L2 fehérjéi kölcsönhatásba lépnek és inaktíválják a SNF1-et és az ADK-t, alátámasztják ezt a teóriát, és rámutatnak arra is, hogy a geminivírusok képesek a gazdaszervezetet saját javukra manipulálni. Tekintve a SNF1/AMPK konzervatív jellegét, feltehető, hogy ezek a kinázok nemcsak a növényekben, de más eukariótákban is szerepet játszanak a vírusok elleni védekezésben.

További kísérleteikben WANG és mtsai (2003) megerősítették, hogy mind az AL2, mind pedig a L2 fehérje kölcsönhatásba lép és inaktiválja az ADK-t *in vitro* és *in vivo* egyaránt *Escherichia coli*-ban és élesztőben való koexpresszióban is. Az ADK expresszió csökkent a vírusfehérjéket expresszáló transzgénikus növényekben és geminivírussal fertőzött növényi sejtekben. Ugyanakkor az ADK aktivitás növekedett a vírusfertőzés után az olyan növényekben, amelyekben más RNS vírusok, vagy a funkcionális *L2* gén-hiányos geminivírus volt jelen. Az AL2 jelen van a fertőzött növényi sejteknek mind a sejtmagjában, mind pedig a citoplazmájában. Ez, valamint a korábbi, az AL2 és L2 SNF1 kináz-gátló hatásával kapcsolatos eredmények azt támasztják alá, hogy az SNF1 által irányított anyagcsere-változások a "veleszületett" antivirális védekezési mechanizmus fontos részei. Az ADK és a SNF1 inaktiválása a geminivírusok kettős stratégiája a növényi védekezési mechanizmus leküzdésére.

#### 2.3.3. A növények védekező mechanizmusainak szuppresszálása

A potyvírusok HcPro fehérjéinek számos funkciója ismert. Szerepük van az autoproteolízisben (CARRINGTON és mtsai, 1990), a levéltetűátvitelben (ATREYA és PIRONE, 1993), a genom amplifikálásban, a növényen belüli vírusterjedésben (KASSCHAU és CARRINGTON, 2001) és a PTGS szuppresszióban (KASSCHAU és CARRINGTON, 1998). Ez a sokféle funkció számos növényi faktorral való kapcsolatot feltételez, amiből jó néhányat már fel is tártak a kétszikűeknél, és legújabban már az egyszikűeknél is (CHENG és mtsai, 2008).

A HcPro és a PTGS szuppresszió kapcsolatáról már több dolgozat született. KASSCHAU és mtsai (2003) szerint a HcPro gátol egyes, az siRNS-ekhez hasonló mikroRNSek (miRNS) által irányított mRNS hasításokat, melyek a növény normális fejlődéséhez szükségesek. Tehát a HcPro nemcsak a vírus elleni védekezést blokkolja, hanem a fejlődést is gátolja.

CHAPMAN és mtsai (2004) a PVY-nal rokon karalábé mozaik vírus (turnip mosaic virus, TuMV) HcPro-jával végzett kísérleteik alapján egy alternatív modellt vázoltak fel a HcPro működésére vonatkozóan. Más szuppresszorok úgy működnek, hogy közvetlenül kötik a miRNS-eket vagy a siRNS-eket, és ezzel gátolják meg a RISC komplex felépülését. Ezzel szemben CHAPMAN és mtsai (2004) modelljében a HcPro azzal a fehérjével (vagy komplexszel) interferál, amelyik a si- és miRNS-eket szállítja a RISC komplexnek. Elképzelhetőnek tartják azt is, hogy indirekt módon egy olyan faktort szuppresszál a HcPro, amelyik a komplex egy vagy több komponensének előállításához szükséges.

A dohány karcolatos vírus (tobacco etch virus, TEV) HcPro-járól kiderült, hogy kapcsolatba lép élesztő két-hibrid rendszerben egy olyan növényi kalmodulin-rokon fehérjével (rgs-CAM), ami maga is egy géncsendesítés szuppresszor (SYLLER, 2006). KASSCHAU és CARRINGTON (2001) megállapították, hogy a hosszútávú terjedésben és a replikációban hibás HcPro részlegesen, vagy egészen elveszíti a szuppresszáló képességét, de a proteolitikus aktivitás ezektől függetlenül megmarad. Ugyanezt a HcPro-t vizsgálták LLAVE és mtsai (2000), akik azt figyelték meg, hogy a HcPro jelenlétében a siRNS-ek mennyisége és a DNS metiláció is csökken. Szerintük a HcPro nem gátolja a növényeknek azt a képességét, hogy a csendesítés

szignálját előállítsák, de lehetetlenné teszi az erre történő válaszadást. MALLORY és mtsai (2001) hasonló következtetésre jutottak, azzal a különbséggel, hogy ők nem találtak a DNS metilálásban különbséget. Mások is megerősítették, hogy a potyvírusok HcPro-ja nem képes blokkolni a géncsendesítés szignáljának szisztemikus terjedését a növényben (SIMÓN-MATEO és mtsai, 2003; MLOTSHWA és mtsai, 2002). MÉRAI és mtsai (2006) megállapították, hogy a TEV HcPro méret-specifikus (21nt) duplaszálú siRNS-kötő szuppresszor, ami megakadályozza a RISC létrejöttét. LAKATOS és mtsai (2006) további bizonyítékokkal támasztották alá azt, hogy a TEV HcPro a duplaszálú siRNS-ek kötésén keresztül éri el szuppresszáló hatását.

PVY *HcPro* génnel transzformált dohánynövények 33°C-on fogékonyabbak voltak egyes vírusokkal történt fertőzéssel szemben, mint 25°C-on (SHAMS-BAKHSH és mtsai, 2007). A potyvírusok HcPro fehérjéjének szerepe hasonló, mint a geminivírusok AL2, illetve L2 fehérjéinek (vírus transzkripció, terjedés, PTGS szupresszió). Noha a funkcionális hasonlóság nem párosul gyakorlatilag semmiféle szekvencia homológiával, úgy gondoltuk, ha működik a geminivírusokéhoz hasonló rendszer a PVY esetében, akkor azt a HcPro házatáján kell keresnünk.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Vegyszerek

Kísérleteinkhez a Reanal, Sigma, Fluka, Bio-Rad és Duchefa cégek által gyártott vegyszereket és az MBI Fermentas, Appligene, Oncor, Startagene és Promega által gyártott enzimeket használtuk. Az izotópokat az Izotóp Intézet Kft.-től szereztük be.

#### 3.2. Plazmidok

A munkánk során használt klónozó vektorokat és létrehozott rekombináns plazmidokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

név	Forrása	Típusa		
pBluescript II SK	Stratagene	<i>E. coli</i> klónozó vektor		
pAD-Gal4	Stratagene	Élesztő két-hibrid rendszer préda vektor		
pBD-Gal4	Stratagene	Élesztő két-hibrid rendszer csali vektor		
pTZ57R/T	Fermentas	<i>E. coli</i> klónozó vektor		
pUC19	Fermentas	<i>E. coli</i> klónozó vektor		
pADStubSNF1	Lovas Ágnes	StubSNF1 cDNS pAD-Gal4-ben		
pBDStubSNF1	Lovas Ágnes	StubSNF1 cDNS pBD-Gal4-ben		
pADPKIN1	Lovas Ágnes	PKIN1 cDNS pAD-Gal4-ben		
pBDPKIN1	Lovas Ágnes	PKIN1 cDNS pBD-Gal4-ben		
pADStubGAL83	Lovas Ágnes	StubGAL83 cDNS pAD-Gal4-ben		
pBDStubGAL83	Lovas Ágnes	StubGAL83 cDNS pBD-Gal4-ben		
pUCPK	Kovács Gabriella	PK cDNS pUC19-ben		
pBlHMGR	Bánfalvi Zsófia	HMGR cDNS pBluescript II SK-ban		
pADHMGR	jelen dolgozat	HMGR cDNS pAD-Gal4-ben		

#### 1. táblázat

#### A kísérletekben használt plazmidok

pBDHMGR	jelen dolgozat	HMGR cDNS pBD-Gal4-ben
pADPK	jelen dolgozat	PK cDNS pAD-Gal4-ben
pBDPK	jelen dolgozat	PK cDNS pBD-Gal4-ben
pADPKr	jelen dolgozat	PK 1-475 bp cDNS pAD-Gal4-ben
pBDPKr	jelen dolgozat	PK 1-475 bp cDNS pBD-Gal4-ben
pADPKv	jelen dolgozat	PK 476-510 bp cDNS pAD-Gal4-ben
pBDPKv	jelen dolgozat	PK 476-510 bp cDNS pBD-Gal4-ben
pADHcPro	Palkovics László	PVY HcPro cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHcPro	Palkovics László	PVY HcPro cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc1	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-820 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc1	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-820 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc2	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-953 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc2	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-953 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc3	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-1291 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc3	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-1291 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc4	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-668 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc4	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-668 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc5	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-253 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc5	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-253 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc6	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-149 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc6	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-149 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc7	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-59 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc7	jelen dolgozat	PVY HcPro 1-59 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc8	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-953 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc8	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-953 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc9	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-668 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc9	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-668 cDNS pBD-Gal4-ben
pADHc10	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-253 cDNS pAD-Gal4-ben
pBDHc10	jelen dolgozat	PVY HcPro 149-253 cDNS pBD-Gal4-ben

#### 3.3. Táptalajok

Az *Escherichia coli* bakteriális munkákhoz LB (VERVLIET és mtsai, 1975), SOB és TB (INOUE és mtsai, 1990), az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) munkákhoz YPAD és SD táptalajokat (http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/media.html) használtunk, amelyeket a megfelelő antibiotikumokkal vagy aminosavakkal egészítettünk ki.

#### 3.4. Baktérium és élesztő törzsek

A klónozási munkához az *Esherichia coli* DH5α (HANAHAN, 1983) törzset használtuk. Az élesztő két-hibrid munkákhoz a *Saccharomyces cerevisiae* Y190, vagy Y187 (Clontech) törzseket használtuk.

#### 3.5. A növények nevelése és fenntartása

A transzformált *Solanum tuberosum* cv. Désirée növényeket *in vitro* növények hajtáscsúcsairól és szárszegmenseiről vegetatív módon szaporítottuk, majd 2% szacharózt tartalmazó RM és MS táptalajon (MURASHIGE és SKOOG, 1962), 16/8 óra fény/sötét fotoperiódus és 5000 lux fényintenzitás mellett, 24°C-on neveltük.

Az *in vivo* kísérletekhez használt növényeket cserepekben, A260-as, steril, 80% rostos tőzeget és 20% perlitet tartalmazó szaporító földkeverékben (Bíró Kertészeti és Kereskedelmi Kft., Szigetszentmiklós), üvegházban tartottuk. A téli időszakban 1-4 órás mesterséges pótmegvilágítást alkalmaztunk.

#### 3.6. PVY vírus tisztítása növényből

A használt PVY vírus izolátumot Dr. Palkovics Lászlótól kaptuk. A vírust burgonya növényen történt passzálást követően *Nicotiana benthamiana* Domin. tesztnövényeken szaporítottuk fel. A fertőzött növényekből 21 nappal az inokuláció után LEISER és RICHTER (1978) módszerével viriont tisztítottunk. A növényekről 100 g levelet szedtünk, amit 200 ml 0,5 M Na-citrát

pufferben (5 mM EDTA, 15 mM Na-DIECA, pH 7,4) homogenizáltunk. A homogenizátumot gézlapokon préseltük át, majd centrifugáltuk (6000 rpm, 15 perc). Triton X-100-at adtunk hozzá 3% (v/v) végkoncentrációig és kevertettük 4°C-on 30 percig. Ezt követően 2 órát centrifugáltuk 30000 g-vel. A csapadékot 10 mM Na-citrát pufferben (1M urea; 0,1% (v/v) merkaptoetanol, pH 7,4) szuszpendáltuk fel, majd újabb 15 percig 15000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszót 20% (w/v) szacharóz oldatra rétegeztük és 2 órán keresztül 50000 g-vel centrifugáltuk. A csapadékra 1 ml 5 mM borát puffert (30 mM NaCl, 3 mM Na-citrát, pH 8) mértünk, és hűtőben állni hagytuk egy éjszakán át. Másnap felvortexeltük jó erősen és 15 percig centrifugáltuk (4°C, 12000 rpm). A vírusrészecskéket tartalmazó felülúszót 1 ml tömény glicerin hozzáadása után további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

#### 3.7. Növények fertőzése PVY vírussal

A növények fertőzéséhez tisztított viriont használtunk. A borát pufferben és glicerinben eltett, 0,6 mg/ml koncentrációjú viriont steril inokuláló foszfát-pufferben (0,14 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,38 g/l NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) vettük fel úgy, hogy a végső virion koncentráció 0,1 µg/ml legyen. A növények leveleire steril kovaport szórtunk, majd növényenként három levelet fertőztünk, levelenként 30 µl inokulummal. Az inokulumot üveg spatulával kentük szét a növények levelein.

A fertőzéseket levéltetvektől mentes általános növényházi körülmények között végeztük. Növényvonalanként 10 növényt fertőztünk 3-6 leveles állapotban, a kiültetés utáni 13-14. napon. A tünetek megjelenésekor, általában a fertőzést követő 10. napon, a növények fertőzöttségét vizuális és PCR analízis módszerrel értékeltük.

#### 3.8. Molekuláris biológiai módszerek

#### 3.8.1. Plazmid DNS tisztítása és emésztése endonukleázokkal

A bakteriális plazmid DNS-t az ún. alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk (SAMBROOK és mtsai, 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 és 3 térfogat abszolút etanollal (-70°C, 20 perc) kicsaptuk, centrifugáltuk (4°C, 20 perc, 12000 rpm), majd a csapadékot 75%-os etanolban kétszer mostuk,
szárítottuk és 20-50 μl desztillált vízben oldottuk vissza. Esetenként a BIO-RAD Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit-et (katalógusszám: 732-6100) használtuk a gyártó utasításai szerint.

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

# 3.8.2. Élesztő RNS tisztítása

Élesztőmintákból az össz-RNS-t STIEKEMA és mtsai (1988) módszerével vontuk ki. Körülbelül 0,5 g élesztőt dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben elporítottunk, kivonó puffer (0,2 M Naacetát pH 5,2, 1% SDS, 10 mM EDTA) és fenol 1:1 arányú keverékével, majd kétszer 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, és LiCl-dal (végkoncentráció: 2,5 M) kicsaptuk. A csapadékot 75%-os etanolban kétszer mostuk, visszaoldottuk (általában 30 µl steril desztillált vízben) és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

#### 3.8.3. Össz-nukleinsav kivonás növényből

A vírusfertőzött növényekből WHITE és KAPER (1989) módszerével vontuk ki a nukleinsavat. A levelekből 2 db 0,5 cm átmérőjű levélkorongot vágtunk ki, jégen lehűtött dörzsmozsárban homogenizáltuk, majd a mintához 400 µl kivonó puffert (50 mM Tris, pH 7,6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, 0,3% merkaptoetanol) adtunk. Fenol-kloroform (50-50%) keverékével, majd kloroformmal extraháltuk, és etanollal kicsaptuk 80 mM Na-acetát jelenlétében, -70°C-on. A centrifugálás (12000 rpm, 25 perc) után nyert csapadékot 70%-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd a nukleinsavat steril desztillált vízben feloldottuk.

#### 3.8.4. cDNS szintézis

Négy  $\mu$ l össz-nukleinsav oldathoz 1 $\mu$ l oligo poliT<sub>2</sub> primert (100 pmol/ $\mu$ l) adtunk, a keveréket 5 percig denaturáltuk 65°C-on. Ezt követően 2 percre jégre tettük és rövid centrifugálás után hozzáadtunk 2  $\mu$ l 5×RT puffert, 1  $\mu$ l dNTPs-t (5mM/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l desztillált vizet, 0,5  $\mu$ l reverz

transzkriptáz enzimet (200 U/µl) és 0,5 µl HPRI RNase inhibitort tartalmazó elegyet. Ezután a mintát 60 percig, 42°C-on inkubáltuk, majd rövid centrifugálás után ismét jégre tettük. Ebből az elegyből 3 µl-t használtunk a PCR reakcióhoz a vírus kimutatására.

# 3.8.5. Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR)

A PCR reakciókat 50 µl végtérfogatban kb. 100 ng templátot, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30-50 pmol primert (2. táblázat), 0,2 mM dNTP keveréket (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10x PCR Taq puffert és 1 U Taq polimeráz enzimet tartalmazó eleggyel végeztük. A reakcióelegyet első lépésben denaturáltuk (5 perc, 94°C), majd 35-40 cikluson át 94°C-on 30 másodpercig, a megfelelő anellálási hőmérsékleten 30 másodpercig és 72°C-on 30-90 másodpercigig inkubáltuk, végül a keletkezett terméket egyszer 10 percig 72°C-on elongáltuk PTC-200 készülékben. A saját tervezésű primereket a BIOMI Kft. gyártotta le. A kísérletekben használt primereket a 2. táblázatban ismertetjük.

Primerek	Szekvencia			
Т3	5'-aat taa ccc tca cta aag gg-3'			
Τ7	5'-gta ata cga ctc act ata ggg c-3'			
Piruvát-kináz kísérletekhez				
PKs1	5'-ggg aat tca tgg cca aca tag aca tag ct-3'			
PKas1	5'-gac acg acg att act tca cg-3'			
PKs2 (PKV)	5'-ggg aat tcg ccc tga agt ctg ccg taa c-3'			
PKas2	5'-ggg gtc gac gct tca agg att acc tc-3'			
PK1-2F	5'-ctc att gtt gtc gcg aca gat ggc ggg a-3'			
PK1-2R	5'-tcc cgc cat ctg tcg cga caa caa tga g-3'			
PK2-2F	5'-atg gcg ggg cta cag caa agg cgg ttg cca a-3'			
PK2-2R	5'-ttg gca acc ccc ttt gct gta gcc ccg cca t-3'			
HcPro kísérletekhez				
Hc1	5'-gg ctg cag ttc atc ttc cgc cta aac-3'			
Hc2	5'-gg ctg cag tag ttg gcg ggt aaa atg ttg-3'			

# 2. táblázat A kísérletekben használt PCR primerek

Hc3	5'-gg ctg cag gag cca aac gag tca acc-3'
Hc6	5'-gg ctg cag cat tat cgc tgc aac tct gcc-3'
Hc7	5'-gg ctg cag gtc caa tcc ctt cca aaa gc-3'
Hc8	5'-ggt cga cgc aga gtt gca gcg ata atg ac-3'
PVY kísérletekhez	
oligo polyT <sub>2</sub>	cgg gga tcc tcg aga agc ttt ttt ttt ttt ttt t
PVY-cp-forw (Bukovinszky)	5'-aag gat ccg ctt tca ctg aaa tga tgg-3'
PVY-cp-rev (Bukovinszky)	5'-agg gaa gct tct aga gtc tcc tga ttg aag-3'

#### 3.8.6. DNS fragmentumok elválasztása és izolálása

A restrikciós emésztés és a PCR során keletkező DNS fragmentumokat 1 vagy 1,2%-os agaróz gélben választottuk el 1 mg/l etídium-bromidot tartalmazó 1xTBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA, pH 8,1-8,3) pufferben és UV fényben tettük láthatóvá. A kívánt DNS fragmentumokat az agaróz gélből szikével és a gyártó utasításait követve, QIAEX II Gel Extraction Kittel (QIAGEN) izoláltuk.

#### 3.8.7. 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 hasító hellyel hoztuk létre a megfelelő 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 fragmentumot feltöltöttük, majd a restrikciós emésztés után ligáltuk a megfelelően emésztett plazmidba. A ligáláshoz a fragmentumból kb. 100 ng-ot, a vektorból 10 ng-ot vettünk, és ehhez 2,5 U T4 ligáz enzimet és a gyártó által mellékelt puffert adtunk 20 µl végtérfogatban. A reakcióelegyet egy éjszakán át, 16°C-on inkubáltuk.

Az elkészült plazmid konstrukció helyességét a nukleotid sorrend meghatározásával ellenőriztük. A szekvenálást a BIOMI Kft. végezte.

### 3.8.8. Kompetens sejt készítés

A kompetens sejteket INOUE és mtsai (1990) módszere szerint készítettük. Lemezen növő *E. coli* DH5 $\alpha$  sejtekből nyolc-tizenkét telepet leoltottunk 120 ml folyékony SOB (kiegészítve 0.6 ml 2M MgCl-dal) tápoldatba. Rázatva növesztettük 18°C-on, amíg 600 nm-en (A<sub>600</sub>) a fényelnyelése (OD) a 0,3-at el nem érte. A sejtszuszpenziót 4°C-on, 3-4000 rpm-mel, 10 percig centrifugáltuk, majd a csapadékot felszuszpendáltuk jégen tárolt TB táplevesben, és 10 percig állni hagytuk jégen. Újabb centrifugálás (4°C, 3-4000 rpm, 10 perc) után a csapadékot 10 ml, 7% DMSO-val kiegészített, TB táplevesben (9,3ml TB + 0,7ml DMSO), folyamatos rázogatás mellett, feloldottuk. A sejtszuszpenziót 10 percig állni hagytuk jégen, majd 200 µl-enként Eppendorf csőbe mértük és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. További felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

#### 3.8.9. Plazmid DNS bejuttatása a baktérium sejtekbe

Az *E. coli* sejtek transzformálását INOUE és mtsai (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- $\beta$ -Dgalaktozidot (IPTG) és 40 µl 20 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid-ot (X-gal) szélesztettük.

# 3.8.10. Élesztő rendszerben végzett kísérletek

# 3.8.10.1. Élesztő transzformálása

Az élesztőt GIETZ és WOODS (1994) módszere szerint transzformáltuk a <u>http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html</u> leírása szerint.

#### 3.8.10.2. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása két-hibrid rendszerben

Az élesztőkolóniák β-galaktozidáz aktivitását JIANG és CARLSON (1996) által használt úgynevezett "filter-lift" teszttel vizsgáltuk a Yeast Protocols Handbook CLONTECH Laboratories leirása szerint (http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT3024-1.pdf).

#### 3.8.11. Northern hibridizáció

#### 3.8.11.1. Filter készítés

Az élesztő RNS mintákból LOGEMAN és mtsai (1987) módszerével 20-20 µg-ot denaturáltunk és formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elválasztottunk. A gélt 20 percig 20xSSC-ben (3M NaCl, 3,3 mM tri-Na-citrát, pH 7,0) mostuk, majd 10xSSC-vel blottoltuk Hybond N membránra. Az RNS-eket UV cross-linker készülékkel és 1 órás 80°C-on való inkubálással fixáltuk a membránra.

#### 3.8.11.2. DNS jelölése radioaktív izotóppal

A northern hibridizációkhoz  $[\alpha^{-32}P]$ -dCTP-vel jelölt, tisztított DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést "random priming" módszerrel (FEINBERG és mtsai, 1983) vagy polimeráz láncreakcióval 2 pmol primer és 100 ng templát jelenlétében  $[\alpha^{-32}P]$ -dCTP (0,8 vagy 1,6 MBq) izotóp beépítésével Taq polimeráz felhasználásával végeztük. A DNS fragmentumokat a be nem épült izotóptól Sephadex G-25 oszlopon választottuk el, majd denaturálás után a hibridizációs pufferhez adtuk.

#### 3.8.11.3. Hibridizációs körülmények

A jelölt próbát a CHURCH és mtsai (1984) által leírt pufferben (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 0,1% SDS, 2xSSC oldatban, 65°C-on, kétszer 20 percig, 0,1% SDS, 0,2xSSC oldattal 15 percig tartó mosással távolítottuk el. Röntgen filmet tettünk a filterre és -70°C-on exponáltuk. Végül a membránra exponálódott képet előhívtuk, szkennerrel digitalizáltuk, és az Adobe System Adobe Photoshop programjával formáztuk és feliratoztuk.

#### 3.9. Fehérjék méret szerinti elválasztása (FPLC)

A fehérjék méret szerinti elválasztását TANG és mtsai (2003) módszerének kisebb módosításával végeztük. Üvegházi növényekről 600 mg tömeg (bulk) mintát szedtünk. A mintát folyékony N<sub>2</sub>-ben egy kis kvarchomokkal elporítottuk és 5 ml extrakciós puffert (50 mM MOPS, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,1% (v/v) Triton X-100) adtunk hozzá. Kimértünk 0,25 g PEG8000-et és két réteg gézlapon keresztül rászűrtük a mintát, addig kevertettük, míg feloldódott a PEG (5%-os kicsapás). Sorvall centrifugával 17000 rpm-mel (34540 g) ülepítettük 20 percig, 4°C-on. A felülúszó újabb kicsapása (0,5 g PEG8000, 15%) után új centrifugálás (17000 rpm, 20 perc, 4°C) következett. A csapadékot feloldottuk 1 ml "A" pufferben (50 mM MOPS, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM DTT). Ezt az 1 ml-t vittük fel az FPLC oszlopra, 2 injektálással. Az oszlopról való lemosást "B" pufferrel ("A" puffer + 500 mM NaCl) végeztük, 2 ml/perces sebesességgel, összesen 8 ml-rel. A mintavétel negyed perces időközönként történt.

#### 3.9. Piruvát-kináz (PK) aktivitás mérés

A PK enzim aktivitásának mérését BURRELL és mtsai (1994) és TURNER és PLAXTON (2000) módszerének felhasználásával, azok kisebb módosításával végeztük. Öt-hetes *in vivo* növények csúcsi levélszintjéről tömeg (bulk) mintát gyűjtöttünk, felhasználásig -70°C-on tároltuk, amiből a méréshez 500 mg-ot használtunk fel. Az extrakció során a mintát folyékony

nitrogénben homogenizáltuk és rögtön 2,5 ml extrakciós puffert (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 28 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, 40 mg/ml polivinil-polipirollidon, 1 mg/ml BSA) adtunk hozzá. A mintát ezután centrifugáltuk (13 000 rpm, 5 perc, 4°C) és a felülúszóból 0,5 ml-t NAP5 anioncserélő oszlopon (GE Healthcare) tisztítottuk és 1 ml extrakciós pufferrel mostuk le. A reakció 250 µl végtérfogatban zajlott, amelynek összetétele a következő volt: 100 mM HEPES (pH 7,1), 40 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ADP, 0,15 mM NADH, 1 U laktát-dehidrogenáz és 30 µl extraktum. A reakciót 5 mM foszfo-enol-piruvát (PEP) hozzáadásával indítottuk el. A módszer azon alapul, hogy a PK a PEP defoszforilálásával piruvátot hoz létre, amelyet a laktát-dehidrogenáz laktáttá alakít, miközben a NADH-ból NAD keletkezik. A NADH 340 nm-en fotometriásan mérhető, és a NADH fogyása pedig egyenesen arányos a PK enzim aktivitásával. A reakcióhoz az alapvonalat a PEP hozzáadása nélküli reakcióelegy mérésével kaptuk.

#### 3.10. Kináz aktivitás mérés SAMS szubsztráttal

A burgonya SnRK1 enzimeinek részleges tisztítását MAN és mtsai (1997) szerint végeztük, 1 g in vitro növényekről gyűjtött levelekből. A fehérje mennyiségét BRADFORD (1976) módszerével határoztuk meg. A SAMS (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 és mtsai, 1997; DAVIES és mtsai, 1989). Folyékony nitrogénben dörzsöltünk el 1 g 5-6 hetes in vitro növényekről származó levelet, majd 1 ml "E" (extrakciós) puffert (0,25 M mannitol, 50 mM HEPES, 50 mM Na-fluorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM benzamidin, 1mM DTT (frissen), 0,1mM PMSF (frissen), pH 8,2) adtunk hozzá. Miután felolvadt 200 µl 5%-os TRITON X-100-at tettünk hozzá. Az így kapott elegyet 13000 rpm-mel, 4°C-on 30 percig centrifugáltuk. A felülúszó óvatos átszívása után ammónium-szulfátot adagoltunk hozzá, úgy, hogy a végső koncentrációja 85 mg/ml legyen (ez a 15%-os kicsapás). A teljes feloldódás után jégen 20 percig lassú rázatás következett. Ezután újabb centrifugálást alkalmaztunk (13 000 rpm, 30 perc, 4°C). A felülúszót ismét egy tiszta Eppendorf csőbe mértük át, és ammónium-szulfátot adagoltunk hozzá 151 mg/ml végkoncentrációig (40%-os kicsapás), a feloldódás után ismét 20 percig jégen rázattuk az elegyet. Újabb centrifugálást (13 000 rpm, 30 perc, 4°C) követően, az üledéket 0,5 ml "F" pufferben (50 mM TRIS, 50 mM Na-fluorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM benzamidin, 1

mM DTT (frissen), 0,1 mM PMSF (frissen), 0,02% Brij 35, pH 8,2) óvatosan fel-le pipettázva oldottuk fel. Az elegyet "F" pufferrel átmosott NAP5 oszlopon tisztítottuk tovább. Az így kapott fehérje oldatot használtuk a reakcióhoz. A reakciót minden esetben 6 felező hígításban mértük össze. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 5 µl extraktum; 5 µl H<sub>2</sub>O; 5 µl "A" puffer (50 mM HEPES, 50 mM Na-fluorid, 1 mM DTT (frissen), pH7,0); 5 µl  $\gamma$  ATP oldat; 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 89%-os foszforsav), majd acetonba mártottuk a papírlapot. Forró thermo-block-on megszárítottuk és celofánba csomagoltuk a papírt. 30 percer Storage Phosphor Screen-t tettünk rá, majd Storm 840 szkennerrel beszkenneltük és az Imagequant 5.2 program segítségével számszerűsítettük az adatokat.

# 4. EREDMÉNYEK

#### 4.1. A burgonya SnRK1 fehérjéi és a PKc kapcsolatának vizsgálata

# 4.1.1. Burgonya SnRK1 szubsztrátok keresése

SUGDEN és mtsai (1999) több növényfaj 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reduktázának (HMGR), nitrát-reduktázának (NR) és szacharóz-foszfát-szintázának (SPS) SnRK1 felismerő és foszforilációs helyeit elemezve az alábbi konszenzus szekvenciát határozták meg: X-[MLIF]-X-[RKY]-X-X-S-X-X-[LMVI]. Ezt a konszenzus motívumot használtuk potenciális SnRK1szubsztrátok keresésére a burgonyában a ScanProsite számítógépes program segítségével. Megállapítottuk, hogy számos enzimen előfordul a keresett motívum. Ezek közül mi a HMGR1-t és a PK<sub>c</sub>-t választottuk a további vizsgálatokra. A HMGR1-et azért, mert már számos más növényfajnál leírták, hogy kapcsolata van az SnRK1-gyel (BALL és mtsai, 1995; BARKER és mtsai, 1996; SUGDEN és mtsai, 1999a), a PK<sub>c</sub>-t pedig azért, mert a PK<sub>c</sub> a glikolízis egyik fontos, jól ismert, és könnyen mérhető enzime, mégsem vizsgálta eddig senki kapcsolatát a SnRK1-gyel.

A StubSNF1 és a HMGR1 kapcsolatát fehérje-interakció kimutatására szolgáló élesztő két-hibrid rendszerben (HOLLINGSWORTH és WHITE, 2004) próbáltuk meg kimutatni. A pBluescript plazmidban lévő HMGR1-re primereket terveztünk, hogy klónozni tudjuk a két élesztő két-hibrid plazmidba, a pAD-Gal4-be és a pBD-Gal4-be. A HMGR1-et a HMGRs és HMGRas primerekkel emeltük ki a pBluescript plazmidból. A fragmentumot feltöltöttük és *Eco*RI enzimmel emésztettük. Az *Eco*RI hasítóhelyet a HMGRs primerre tervezve építettük hozzá a fragmentumhoz, hogy az olvasási keretet megőrizve klónozhassuk az élesztő plazmidba. A HMGR1 fragmentumot *Eco*RI és *Sma*I enzimekkel emésztett pBD-Gal4 plazmidba ligáltuk. Innen a HMGR1 inzertet *Eco*RI és *Xba*I emésztéssel emeltük ki és a fragmentum izolálása után egy ugyanígy emésztett pAD-Gal4 plazmidba építettük be. Az így kapott pADHMGR és pBDHMGR plazmidokat Y190-es élesztő törzsbe transzformáltuk pBDStubSNF1-gyel illetve pADStubSNF1-gyel együtt a megfelelő párosításban. Elvégeztük a "filter-lift" esszét, de azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a HMGR1 és a StubSNF1 között élesztő két-hibrid rendszerrel kimutatható kapcsolat nincs. Az azonban lehetséges, hogy a HMGR1 és a PKIN1 között van

kölcsönhatás, de ezt, mivel a párhuzamosan, a PK<sub>c</sub>-vel végzett kísérletek pozitív eredményt adtak, nem vizsgáltuk.

A PK<sub>c</sub>-én két potenciális SnRK1 felismerő helyet is találtunk. Ezek szekvenciája a következő volt: VLTRGGS<sup>406</sup>TAKL és ALHRIGS<sup>500</sup>ASVI. A PK<sub>c</sub> és a burgonya két SnRK1-e közti kapcsolat vizsgálatát ugyancsak élesztő két-hibrid rendszerben végeztük (4. ábra). A PKc a pUC19 plazmidban volt a SalI helyen (ezt a plazmid-konstrukciót a csoportunkban dolgozó Kovács Gabriella készítette). A pUC19-ből PKs1 és PKas1 primerekkel emeltük ki a PKc gént és az EcoRI és a SmaI hasítóhelyek közé építettük be a pAD-Gal4-be és a pBD-Gal4-be. A StubSNF1-et és a PKIN1-et LOVAS és mtsai (2003) már korábban klónozták ebbe a két vektorba. Az így elkészült konstrukciókat, a szekvenciák ellenőrzése után, a megfelelő párosításban (pADStubSNF1-pBDPK<sub>c</sub>; pADPKIN1-pBDPK<sub>c</sub>; pBDStubSNF1-pADPK<sub>c</sub>; pBDPKIN1-pADPK<sub>c</sub>) élesztőbe transzformáltuk. A szelekció után "filter-lift" esszével teszteltük a reakciót. A kísérlet eredménye szerint mind a StubSNF1, mind a PKIN1 felismeri és kapcsolatba lép a PK<sub>c</sub>-vel függetlenül attól, hogy melyiket használjuk csalinak és melyiket prédának.

A felismerő hely lokalizálására deléciós származékokat készítettünk a PK<sub>c</sub>-ből oly módon, hogy a származékok csak a  $S^{406}$  vagy a  $S^{500}$  körüli motívumot tartalmazták. Megállapítottuk, hogy a burgonya PK<sub>c</sub> S<sup>406</sup> körüli motívuma tökéletesen megegyezik a szója PKc-én lévő S<sup>407</sup> körüli motívummal. A pozíciókülönbség oka a szója PKc-jában lévő extra Q a 14-es pozícióban. A S<sup>500</sup> körüli régió is hasonló a két fajban, de a szójában T van az S helyett ebben a pozícióban. A deléciós származékok megtervezésénél figyelembe vettük azt is, hogy a PK<sub>c</sub> egyik lehetséges poszttranszlációs szabályozási útja egy kb. 4 kDa-os rész levágódása a Cterminális végről, ami egy stabilabb aktív formát eredményez a szójában (TANG és mtsai. 2003). Feltételeztük, hogy ez így van a burgonyában is, mivel a szója PK<sub>c</sub> 89%-ban homológ a burgonya PK<sub>c</sub>-vel. A burgonya PK<sub>c</sub>-jén az egyik foszforilációs hely éppen ezen a potenciálisan levágódó részen van. Így a két tervezett deléciós származék a PK<sub>c1-475</sub> és a PK<sub>c476-510</sub> lett. A fragmentumok előállítását az előzőhöz hasonlóan PCR-rel, a PKs1-PKas2 és PKs2-PKas1 primer párokkal végeztük, és a pAD-Gal4, illetve pBD-Gal4 vektorokba építettük. Ezeket a konstrukciókat is élesztő két-hibrid rendszerben teszteltük. A PK<sub>c1-475</sub> deléciós származék egyik SnRK1-gyel sem adott pozitív eredményt, míg a PKc476-510 mindkettővel interakcióba lépett. Ebből arra következtettünk, hogy a S<sup>500</sup> körüli felismerő hely szükséges és elégséges a kapcsolathoz mindkét SnRK1 esetében. (4. ábra).



#### 4. ábra A burgonya SnRK1-ei és a PK<sub>c</sub> kapcsolata

A baloldalon lévő számok a vizsgált PK fragmentum aminosavszámát jelentik. A téglalapok a  $PK_c$ -t szimbolizálják, kiemelve rajtuk a potenciális SnRK1 felismerő helyeket. Jobboldalon a két burgonya SnRK1-gyel való "filter-lift" esszé eredménye: +, van kölcsönhatás; -, nincs kölcsönhatás.

#### 4.1.2. Az antiszensz burgonya vonalak SAMS-peptid foszforilációs aktivitása

SUGDEN és mtsai (1999) megállapították, hogy az eredetileg az állati AMPK-k és az élesztő SNF1 számára tervezett specifikus szubsztrátot, a SAMS-peptidet, a növényi SnRK1-ek is foszforilálni tudják. Azóta általánosan elterjedt, hogy ezt a peptidet használják a növényi SnRK1-ek aktivitásának méréséhez. Így mi is ezzel a peptiddel vizsgáltuk meg azt, hogy a két burgonya SnRK1 katalitikus alegységeinek, illetve a StubGAL83 alegységnek az antiszensz gátlása hogyan befolyásolja a SAMS-peptid foszforilációjának mértékét. Az antiszensz burgonya vonalakat Lovas Ágnes állította elő (LOVAS, 2003). Mi a vizsgálatainkban az antiszensz StubGAL83-at (aG), az antiszensz StubSNF1-et (aS), az antiszensz PKIN1-et (aP), és olyan antiszensz burgonya vonalakat használtunk, amelyekben mind a StubSNF1 mind a PKIN1 gátolva volt (aPS). Három aG vonalat, és két-két aS, aP, aPS vonalat vontunk be a vizsgálatokba.

A SnRK1-eket *in vitro* antiszensz növényeink leveleiből részlegesen tisztítottuk, kontrollként vad típusú Désirée növényeket használtunk. Az SnRK1-ek aktivitására a SAMS-peptid foszforilációjának mértékéből következtettünk. Az antiszensz vonalak aktivitási értékei a kontrollhoz képest 25-75%-kal alacsonyabbak voltak és átlagosan 14% szórást mutattak (5. ábra). Ez alól csak az aG5 vonal volt kivétel. Erre a vonalra rendkívül magas, 64%-os szórás érték volt jellemző: az ismétlések során háromszor magasabb, háromszor alacsonyabb aktivitása volt, mint a kontrollnak (5. ábra). Úgy gondoljuk, hogy ez az antiszensz gátlás tökéletlenségének, egyfajta mozaikosságnak a következménye. A transzgénikus növények

esetében gyakran előfordul, hogy néhány vonal a várttal ellentétes vagy megmagyarázhatatlan eredményt ad (De Block, 1993; Birch, 1997). Az ilyen vonalakat általában kiszelektálják, és nem vizsgálják tovább. Így tettünk mi is, bár addigra már elvégeztük azokat a kísérleteket is, melyekről a 4.9.2. fejezet szól. A másik két aG vonal SAMS-peptid foszforilációs aktivitása azonban egyértelműen alacsonyabb volt, mint a vad típusú növényeké. Ez megerősíti azt a korábbi feltételezést (Toldi és mtsai, nem közölt eredmények), hogy a StubGAL83 a StubSNF1 pozitív regulátora.





Összehasonlítva az aP, aS, aPS vonalak SAMS-peptid foszforilációs aktivitását a Sós-Hegedűs Anita és Antal Ferenc által végzett PKIN1- és StubSNF1-specifikus kisRNS-ek kimutatására irányuló, és a PKIN1- és StubSNF1-specifikus próbákkal végzett northern vizsgálatok eredményeivel (dolgozatban nem szereplő kísérletek) azt tapasztaltuk, hogy ahol több kisRNS volt és ahol a hibridizációval detektálható gátlás is nagyobb volt az aP, aS és aPS vonalakban, ott a SAMS-peptid foszforilációs aktivitási értékek is alacsonyabbak voltak. Különösen hangsúlyos volt ez a jelenség az aPS vonalakban.

## 4.1.3. Az antiszensz burgonya vonalak PK aktivitása

A PK aktivitásának, a fény-sötét periodikus változásának megfelelően, napi ciklusa van. Dohányban ez a ciklus úgy alakul, hogy az aktivitás a sötét periódus alatt magas, majd a fény periódus közeledtével elkezd csökkenni, és ez a csökkenés tart a fényszakasz nyolcadik órájáig. Ezután emelkedni kezd a PK aktivitás és a sötét beállta után éri el a maximumát (SCHEIBE és mtsai, 2000). A burgonyában ehhez nagyon hasonló ciklikus változást találtunk, kétszeres különbséggel a minimum és a maximum értékek között (6. ábra). A SnRK1-ek gátlásának a PK aktivitásra kifejtett hatását a napi ciklus nyomon követésével végeztük. Azonos körülmények között növő antiszensz transzgénikus vonalaink és a vad típusú burgonya növények PK aktivitását négyóránként megmértük. Az így kapott eredményekből látszik, hogy a transzgénikus növényekben mérhető PK ciklus egyértelműen és következetesen eltér a vad típusú növényekben mérhetőtől (6. ábra). Az aP vonalakban a ciklus úgy módosult, hogy a nappali alacsony aktivitású periódus megnyúlt és a maximum eltolódott. Így a csúcs a vad típushoz képest négy órával később, az éjszaka közepén jelent meg az aP vonalakban. Az aS vonalakban ezzel szemben a napi változás alig volt kimutatható, gyakorlatilag kis ingadozással éjjel-nappal alacsony alapértéken működött a PK, nem volt tehát éjszakai csúcs. A két aPS vonalban, érdekes módon, nem volt egységes a kép. Az aPS4 vonal az aP növényekhez hasonlóan viselkedett, míg az aPS7 vonalban a PK aktivitási görbéje az aS vonalakéhoz hasonlított.

Nemcsak az előző fejezetben ismertetett SAMS-peptid foszforilációs aktivitások, de a PK aktivitási értékek is jól korrelálnak a Sós-Hegedűs Anita és Antal Ferenc által végzett kisRNS és northern vizsgálatok eredményeivel. Az aPS7 vonalban a kisRNS és northern vizsgálatok azt mutatták, hogy csak a StubSNF1 gátlása volt sikeres, a PKIN1 mRNS mennyisége nem, vagy csak alig csökkent, és PKIN1 specifikus kisRNS-ek sem voltak kimutathatók. Nem meglepő tehát, hogy az aPS7 vonalban a PK aktivitási görbe az aS vonalakéhoz volt hasonló. Ezzel szemben az aPS4 vonalnál a kisRNS és northern vizsgálatok tanúsága szerint sikeres volt a PKIN1 gátlása, megjelentek a PKIN1-specifikus kisRNS-ek és a PKIN1 mRNS mennyisége is jelentős mértékben csökkent. Így érthető, hogy ez a vonal az aP vonalakhoz hasonló PK aktivitási görbét mutatatott.

Megállapítható tehát, hogy mindkét SnRK1 antiszensz gátlása befolyásolja a PK aktivitás periodicitását és intenzitását, de eltérő módon, azaz az StubSNF1 és PKIN1 szerepe nem azonos.





**Des**, kontroll; **aP**, antiszensz PKIN1; **aS**, antiszensz StubSNF1; **aPS**, antiszensz PKIN1-StubSNF1; az aktivitás mértékegysége: μmol/perc/mg fehérje

# 4.1.4. Az antiszensz burgonya vonalak fehérjéinek elválasztása, FPLC-frakcióinak PK aktivitása

TANG és mtsai (2003) a szójával végzett kísérleteik során arra jöttek rá, hogy a PK<sub>c</sub> poszttranszlációs szabályozásának egyik módja a foszforiláció és az ubiquitinhez kötött lebontás, másik módja egy kb. 4 kDa nagyságú rész levágódása a C-terminális végről, ami egy stabilabb aktív PK<sub>c</sub> formát eredményez. A fejlődő szójamagban a szintetizálódó 55 kDa nagyságú PK<sub>c</sub> mennyisége az idő előrehaladtával folyamatosan csökken, miközben az 51 kDa nagyságú származék feldúsul. FPLC kísérletekkel sikerült elkülöníteniük a két PKc formát. A szója és a burgonya PK<sub>c</sub> szekvenciája 89%-ban egyezik. Ennek fényében kíváncsiak voltunk arra, hogy a burgonyában, a szójához hasonlóan, el lehet-e különíteni a két PKc formát, és ha igen, akkor vajon a SnRK1-ek gátlása befolyásolja-e a burgonyalevélben detektálható PKc formák arányát? Ehhez a burgonya levelekből kinyert fehérjeelegyet FPLC oszlopon próbáltuk meg méret szerint szétválasztani és meghatározni az így nyert frakciók PK aktivitását. Az eredményeket a 7. ábrán mutatjuk be. Az ötödiktől a tizedik frakcióig volt PK aktivitása a mintáknak. Az aktivitás, az aS6 vonal kivételével, a transzgénikus vonalaknál magasabb, mint a vad típusnál, ami a mintavétel időpontjában - a fényperiódus kezdete után kb. négy órával - egybevág a napi ciklus mérése során kapott értékekkel. TANG és mtsai (2003) kísérleteinek eredményét ismerve feltételezzük, hogy a 7. frakcióban lévő aktivitási csúcs a teljes hosszúságú, kb. 55 kDa nagyságú PK formának, míg a 9. frakciónál látható kis "váll" a rövidebb, kb. 51 kDa nagyságú formának felel meg. A kétféle PK formát azonban sajnos nem sikerült ennél jobban elkülönítenünk sem gyakoribb frakciógyűjtéssel, sem az oszlop lemosásának elnyújtásával. Így nem volt kellően tiszta anyagunk ahhoz, hogy gélben megfuttassuk, és pontosan meghatározzuk a PK aktivitást mutató molekulák tömegét.



7. ábra FPLC-frakciók PK aktivitása

K, kontroll; **aP1, aP2**, antiszensz PKIN1 vonalak; **aS5, aS6**, antiszensz StubSNF1 vonalak; **aPS4, aPS7**, antiszensz PKIN1-StubSNF1 vonalak

#### 4.2. A burgonya SnRK1 fehérjéi és a PVY HcPro fehérjéje közti kapcsolat vizsgálata

#### 4.2.1. A kapcsolat kimutatása

A geminivírusok AL2, illetve L2 fehérjéinek hasonló szerepe van, mint a potyvírusok HcPro fehérjéjének. Noha a funkcionális hasonlóság nem párosul gyakorlatilag semmiféle szekvencia homológiával, feltételeztük, hogy működik a geminivírusokéhoz hasonló rendszer (lásd 2.3.2.2 fejezet) a PVY esetében is, és a HcPro kapcsolatba lép a burgonya valamelyik SnRK1-ével.

Azért, hogy kiderítsük, hogy a PVY HcPro fehérjéje valóban képes-e kapcsolatba lépni a burgonya két SnRK1 komplexével, a PK<sub>c</sub> kísérletekhez hasonlóan, élesztő két-hibrid kísérletet végeztünk. Az élesztő plazmidokban lévő *HcPro* gént a *StubSNF1*-gyel, a *PKIN1*-gyel, és a *StubGAL83*-mal a megfelelő párosításban élesztőbe transzformáltuk (pADStubSNF1-pBDHcPro, pADPKIN1-pBDHcPro, pADStubGAL83-pBDHcPro, pBDStubSNF1-pADHcPro, pBDPKIN1pADHcPro, pBDStubGAL83-pADHcPro). Az így kapott élesztő vonalakkal a szelekció után elvégeztük a "filter-lift" esszét. Azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy sem a StubSNF1-gyel, sem a PKIN1-gyel nem mutatható ki interakció, míg ha a HcPro csaliként szerepel az élesztőben és a StubGAL83 a préda, akkor jól detektálható kölcsönhatás van a két fehérje között (3. táblázat). Ellenkező felállásban, tehát, ha a HcPro prédaként és a StubGAL83 csaliként volt jelen, negatív volt a teszt eredménye. Ennek az lehet a legvalószínűbb magyarázata, hogy a pBD plazmidban expresszálódó fúziós fehérje (a GAL4 DNS-kötő domén – HcPro) olyan konformációt vesz fel, ami lehetetlenné teszi a StubGAL83-mal a kapcsolat létrejöttét.

A HcPro és a	a hurgonya SnRk	1 alegységei	között kimutat	ható interakció
	i buigonya biiki	and groups and gr	NOLULI MIIIULUL	nato miterancio

Préda	StubSNF1	PKIN1	StubGAL83	HcPro	pBD
Csali					
StubSNF1	-	-	+	-	-
PKIN1	-	-	-	-	-
StubGAL83	+	-	-	-	-
HcPro	-	-	+	-	-
pAD	-	-	-	-	-

# 4.2.2. A StubGAL83 és a PVY HcPro fehérje kapcsolatának igazolására készített kontroll northern kísérlet

Az eredmények meglepő volta miatt kontroll kísérletet végeztünk annak bizonyítására, hogy nem cseréltük fel az élesztő vonalakat, és a burgonya SnRK1 komplex alegységei közül valóban a StubGAL83-mal létesít kapcsolatot a HcPro. RNS-t tisztítottunk a vizsgált élesztővonalakból és northern hibridizációs kísérletekben ellenőriztük a *StubSNF1*, a *PKIN1*, a *StubGAL83* és a *HcPro* transzkriptumok jelenlétét az élesztőkben. A northern hibridizációk eredményei igazolták, hogy az élesztő két-hibrid tesztek során interakciót jelző vonalakban valóban a *StubGAL83* és a *HcPro* expresszál (8. ábra).



8. ábra: Northern hibridizációk élesztő törzsek ellenőrzésére

1, pBDStubSNF1-pADStubGAL83; 2, pADHcPro-pBD; 3, pADHcPro-pBDStubGAL83; 4, pADHcPro-pBDPKIN1; 5, pADHcPro-pBDStubSNF1; 6, pBDHcPro-pAD; 7, pBDHcPro-pADStubGAL83; 8, pBDHcPro-pADPKIN11; 9, pBDHcPro-pADStubSNF1; A + és – jelek az előző fejezetben leírt két hibrid kísérletek eredményét mutatják.

# 4.2.3. A StubGAL83 és a PVY HcPro fehérje kapcsolatához szükséges HcPro régió lokalizálása

## 4.2.3.1. A klónozási stratégia

A PVY *HcPro* génje 1394 bp hosszúságú. Kíváncsiak voltunk, hogy a HcPro fehérje melyik régiója felelős a StubGAL83-mal való kapcsolatért. Ezért deléciós származékokat készítettünk a 9. ábrán látható stratégia szerint. A pAD-HcPro plazmidból *SalI-PstI* enzimekkel kivágtuk a *HcPro* gént és egy hasonlóan emésztett pBluescriptKS plazmidba klónoztuk. A kapott pBluescriptKS-HcPro plazmidból T3 és saját tervezésű primerek segítségével (lásd Anyagok és módszerek 3.8.5. fejezet) különböző hosszúságú *HcPro* fragmentumokat izoláltunk. Az így nyert Hc1-et, Hc2-t, Hc3-at, Hc6-ot és Hc7-et feltöltés után emésztettük *SalI*-gyel és *PstI*-gyel, hogy az ugyanezen enzimekkel emésztett pAD-GAL4 és pBD-GAL4 élesztő két-hibrid plazmidokba ligálhassuk őket. A Hc4-et és a Hc5-öt restrikciós endonukleáz emésztéssel a Hc1-ből állítottuk elő. A pBD-Hc1-et és a pAD-Hc1-et *Bpu1102I-PstI*-gyel és *OliI-PstI*-gyel emésztettük, majd emésztés után agaróz gélen választottuk el a fragmentumokat. A *HcPro* fragmentumokat tartalmazó plazmidokat izoláltuk és emésztettük, majd a ragadós végek feltöltése után, a vektorokat egy ligálási lépéssel gyűrűvé zártuk. A *Bpu1102I-nek* és az *OliI-nek* a *HcPro* génen van felismerő helye, míg a *PstI* hasítóhely a primerekre volt tervezve, a plazmidba való beépíthetőség kedvéért.

Az élesztő két-hibrid tesztek alapján a Hc5 volt a legrövidebb fragmentum, amelyik még kapcsolatot tudott teremteni a StubGAL83-mal (lásd következő fejezet). Az interakcióhoz szükséges régió pontosabb meghatározására a gént a másik végéről is rövidítettük. A Hc8 fragmentumot pBluescriptKS-HcPro plazmidból a Hc8 és a Hc1 primerek segítségével hoztuk létre. A PCR terméket feltöltés és *SalI-Pst*I emésztés után a két-hibrid plazmidokba építettük be. A pADHc9-et, pBDHc9-et, pADHc10-et és pBDHc10-et pedig újra *Bpu*1102I, *Oli*I, és *Pst*I restrikciós edonukleázok felhasználásával hoztuk létre a pADHc8-ból illetve a pBDHc8-ból kiindulva.

Az élesztőbe transzformálás előtt szekvenálással győződtünk meg róla, hogy a fragmentumok valóban frémben épültek-e be a plazmidokba, vagyis, hogy a leolvasási keret nem tolódott el.



9. ábra: A HcPro deléciós származékok elkészítésének stratégiája

#### 4.2.3.2. A két-hibrid kísérletek

A PVY vírus *HcPro* génjéből készített deléciós származékok által kódolt fehérjék StubGAL83mal való kapcsolatát élesztő két-hibrid rendszerben vizsgáltuk. A gén rövidítését a 3' végéről kezdtük, és hét különböző hosszúságú HcPro származékot hoztunk létre. A pAD-GAL4-ben lévő *HcPro* fragmentumokat a pBDStubGAL83-mal, a pBD-GAL4-ben lévő *HcPro* fragmentumokat a pADStubGAL83-mal transzformáltuk élesztőbe. A fehérjék kapcsolatát "filter-lift" esszével vizsgáltuk. A Hc5 jelű rövidítés volt az utolsó, ami még kapcsolatba tudott lépni az StubGAL83mal (10. ábra). Hasonlóan a teljes hosszúságú HcPro-hoz, a Hc5 kivételével, minden HcPro származék csak csaliként adott pozitív eredményt. A Hc5 esetében azonban még akkor is pozitív eredményt kaptunk, amikor a Hc5 volt a pBD-GAL4 plazmidban, tehát nem csaliként, hanem prédaként szerepelt a kísérletben. Ennek oka feltehetően az, hogy a GAL4 DNS-kötő domén-Hc5 fúziós fehérje konformációja olyan szerencsés, hogy még prédaként is lehetővé teszi a StubGAL83-mal való kapcsolat létrejöttét. A HcPro StubGal83-kötő helyének pontosítására három 5' végi deléciós származékot is előállítottunk. Megállapítottuk, hogy mindhárom 5' végi csonka HcPro származék kapcsolatba lép a StubGAL83-mal (10. ábra). Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a kapcsolatért a HcPro 149-253 bp közé eső szakasza a felelős. Ez a 104 bázispár a következő 34 aminosavnak felel meg: HSILPCYKITCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHA.



10. ábra: A PVY vírus *HcPro* génjéből készített deléciós származékok által kódolt fehérjék
StubGAL83-mal való kapcsolatának vizsgálata élesztő két-hibrid rendszerben
+, van kölcsönhatás; -, nincs kölcsönhatás

#### 4.2.4. Vírusfertőzési kísérletek

### 4.2.4.1. A kísérletekhez szükséges víruskoncentráció meghatározása

A kísérletekben használt PVY vírus-izolátumot Dr Palkovics Lászlótól kaptuk. A vírust burgonya növényen történő passzálást követően *Nicotiana benthamiana* Domin.

tesztnövényeken szaporítottuk fel. A fertőzött növényekből az inokuláció után 21 nappal LEISER és RICHTER (1978) módszerével viriont tisztítottunk. A tisztított virion koncentrációja a glicerinben 0.6 mg/ml volt.

Mivel a StubGAL83 és a HcPro között élesztő két-hibrid rendszerben kimutattuk a kapcsolatot, és a HcPro-ról ismert, hogy fontos szerepe van a vírusfertőzés folyamatában, felmerült a gondolat, hogy van-e ennek a kapcsolatnak hatása a vírus fertőzési folyamatára. Úgy gondoltuk, hogy az antiszensz StubGAL83 növények vírusfertőzésével a végére járhatunk ennek a kérdésnek. Feltételeztük, hogy az antiszensz StubGAL83 növények vírusfertőzésével a végére járhatunk ennek kismértékben tér el a vadtípusú burgonya növényekétől, ha egyáltalán eltér, hasonlóan HAO és mtsai (2003) által a L2 és AL2 valamint az SNF1 kapcsolatában tapasztaltakhoz. Annak érdekében, hogy a vadtípusú és a transzgénikus növények közötti fogékonysági különbséget minél érzékenyebben ki tudjuk mutatni, azt a víruskoncentrációt kellett megtalálni, ami még éppen képes megfertőzni a vadtípusú növényeket.

Üvegházban kiültetett kéthetes vadtípusú Désirée burgonya növényeket öt csoportban fertőztünk, csoportonként 3-3 növényt 0.1, 1, 5, illetve 10  $\mu$ g/ml koncentrációjú PVY inokulummal. A tünetek megjelenésekor, a 10. napon, mintát szedtünk a növényekről és totál nukleinsavat izoláltunk, amiből cDNS-szintézis után PCR-rel mutattuk ki a vírus-RNS jelenlétét. Mivel a 0.1  $\mu$ g/ml koncentrációjú vírus inokulum is még képes volt szisztemikusan fertőzni a három burgonyanövény közül kettőt, ezért úgy határoztunk, hogy a további kísérletekben 0.1  $\mu$ g/ml töménységű inokulumot fogunk használni a növények fertőzéséhez.

## 4.2.4.2. Az aG növények PVY fogékonysága

A fertőzéseket levéltetvektől mentes általános növényházi körülmények között végeztük. Három antiszensz StubGAL83 transzgénikus burgonya vonalat (aG1, aG5, aG6) vizsgáltunk. Növényvonalanként 10 növényt fertőztünk 3-6 leveles állapotban, a kiültetés utáni 13-14. napon. A növények fertőzéséhez tisztított viriont használtunk. A borát pufferben és glicerinben eltett, 0.6 mg/ml koncentrációjú viriont steril inokuláló foszfát-pufferben hígítottuk úgy, hogy a végső virion koncentráció 0.1 µg/ml legyen. Növényenként 3 alsó levelet fertőztünk, levelenként 30 µl inokulummal. A fertőzést követő 9-10. nap a tünetek felső leveleken való megjelenését vizuálisan, a fertőzöttség mértékét pedig PCR segítségével állapítottuk meg.

A három ismétlésben végzett vírusfertőzési kísérletek eredményét a 11. ábra mutatja be. Az aG6 vonal minden kísérletben nagyobb (60-100%) fogékonyságot mutatott, mint a vad típus (40-70%). Az aG5 vonalnak minden kísérletben kevesebb egyede fertőződött meg (10-40%) mint a kontrollnak. Az aG1 vonal két kísérletben nagyobb ellenállóságot mutatott, mint a kontroll (10 és 30%), míg egy kísérletben több egyede (60%) betegedett meg, mint a kontrollnak (40%).



11. ábra A Désirée és három antiszensz StubGAL83 vonalának (aG1, aG5, aG6) érzékenysége a PVY-fertőzésre

Az értékelés a fertőzést követő 10. napon történt

Az eredmények igen nagy szórást mutatnak, ami több tényező együttes fennállásának a következménye. Egyrészt a helyhiány, a növényszaporítási és a feldolgozási kapacitás szűkössége miatt, a kísérleteinket vonalanként csak 10-10 egyeden végeztük. Így, ha egy vonalnál két kísérletben egy növénnyel több vagy kevesebb fertőződött meg, az máris 10%-os különbséget jelentett a statisztikában. Ez a hiba nagyobb egyedszám használatával, vagy a kísérlet többszöri megismétlésével csökkenthető. Ugyanakkor az is ismert, hogy a növények vírussal való megfertőződésének eredményessége nem csupán a megfelelő időben és vírus-inokulum koncentrációval elvégzett fertőzéstől függ, hanem a környezeti körülményektől is (pl. hőmérséklet, páratartalom), amelyek egyenletességét a rendelkezésünkre álló üvegházakban nem sikerült biztosítanunk.

# 4.3. Új tudományos eredmények

Munkánknak kettős célja volt. Az egyik cél a kutatócsoport által korábban megkezdett vizsgálatok folytatása, a PKIN1, StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék működésének vizsgálata: az antiszensz transzgénikus növények SnRK1 aktivitásának mérése, és a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában betöltött szerepük tanulmányozása a burgonya piruvát-kinázával való kapcsolatuk feltárása révén. Munkánk másik célja az volt, hogy megvizsgáljuk, létezik-e a burgonya SnRK1 komplexei és a burgonya Y vírus HcPro fehérjéje között a HAO és mtsai (2003) által az *Arabidopsis*-ban megfigyeltekhez hasonló kapcsolat, és amennyiben igen, akkor ezt a kapcsolatot jellemezzük is.

A kapott tudományos eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

- A burgonya *PK<sub>c</sub>* génjét és két deléciós származékát, amelyek külön-külön tartalmazzák a szekvencia elemzéssel azonosított, feltételezett SnRK1 felismerő helyeket, élesztő kéthibrid plazmidokba klónoztuk. Élesztő két-hibrid kísérletekkel igazoltuk, hogy mind a StubSNF1, mind a PKIN1 felismeri és kapcsolatba lép a PK<sub>c</sub> 500. pozícióban lévő szerin aminosava körüli SnRK1 felismerő konszenzus szekvenciával.
- 2. Igazoltuk, hogy az antiszensz StubSNF1, PKIN1 és StubGAL83 transzgénikus növényekben az SnRK1 aktivitás csökken, és ez az enzimaktivitás csökkenés összhangban van a géncsendesítés mértékével. Az antiszensz StubGAL83 növények aktivitásának csökkenéséből arra következtettünk, hogy a StubGAL83 a StubSNF1 pozitív regulátora.
- 3. Megállapítottuk, hogy az antiszensz StubSNF1, PKIN1, és a mindkét kináz aktivitásában gátolt transzgénikus növények PK aktivitásának napi ciklusa különbözik a vad típusú burgonya PK aktivitásának napi ciklusától. Tehát, mind a StubSNF1, mind a PKIN1 befolyásolja a PK aktivitás ciklikus napi változását. A StubSNF1 és PKIN1 hatása azonban eltérő. Ez az eredmény alátámasztja kutatócsoportunk korábbi megállapítását, miszerint a két SnRK1 szerepe eltérő a burgonyában.

- 4. Igazoltuk, hogy a PVY HcPro fehérjéje és a burgonya StubGAL83 fehérjéje kapcsolatba lép élesztő két-hibrid rendszerben.
- 5. A PVY *HcPro* gén tíz deléciós származékát állítottuk elő. Segítségükkel élesztő kéthibrid rendszerben lokalizáltuk a HcPro fehérjének azt a régióját (149-253 bp), ami szükséges a StubGAL83-mal való kapcsolat létrehozásához. A 34 aminosavból álló régió aminosav sorrendje: HSILPCYKITCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHA
- 6. Vírusfertőzési kísérleteink arra utalnak, hogy az antiszensz StubGAL83 transzgénikus burgonya növények másképp reagálnak a vírusfertőzésre, mint a vad típusú burgonyanövények.

# 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

#### 5.1. A burgonya SnRK1 komplexei befolyásolják a PKc aktivitást

Az SNF1 protein-kináz család tagjainak, a különböző metabolikus útvonalak szabályozása révén, szerepe van a környezeti hatásokra adott sejtszintű válaszokban (STONE és WALKER, 1995). Az élővilágban általánosan előforduló, az SNF1 protein-kináz családba tartozó enzim komplexek szerkezete, működése, célszekvenciája és szabályozása nagyon hasonló.

Munkacsoportunkban Lakatos Lóránt izolálta és részlegesen jellemezte a burgonya két SNF1-rokon kinázának cDNS-ét, a *PKIN1*-et és *StubSNF1*-et, és a StubSNF1-gyel interakcióba lépő fehérjét kódoló cDNS-t, a *StubGAL83*-at (LAKATOS és BÁNFALVI, 1997; LAKATOS és mtsai, 1999), Lovas Ágnes pedig részletesen jellemezte ezeket a géneket és az antiszensz transzgénikus növények fenotípusának vizsgálatából következtetett az általuk kódolt fehérjék funkciójára (LOVAS, 2003). További feladatunk volt a PKIN1, StubSNF1 és StubGAL83 fehérjék működésének még részletesebb megismerése, az antiszensz transzgénikus növényekben lévő PKIN1 és StubSNF1 enzimek együttes aktivitásának mérése, a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában betöltött szerepük vizsgálata, a piruvát-kináz enzimmel való kapcsolatuk feltárása.

A korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy az antiszensz StubSNF1, PKIN1 és StubGAL83 transzgénikus növényekben csökkent a gátlásnak megfelelő mRNS mennyisége és megjelentek a specifikus siRNS-ek is (LOVAS, 2003), azonban a gátlás mértékének tisztázásához elengedhetetlenül fontos volt a növényekben az SnRK1 aktivitás megmérése. Megállapítottuk, hogy az antiszensz vonalak aktivitási értékei a kontrollhoz képest 25-75%-kal alacsonyabbak. Ezek az általunk kapott eredmények jól korreláltak a korábban Sós-Hegedűs Anita és Antal Ferenc által készített siRNS és northern vizsgálatok eredményeivel - ahol a hibridizációval detektálható gátlás nagyobb volt, ott az enzim aktivitási értékek is alacsonyabbak voltak. Különösen szembetűnő volt ez a kettős antiszensz PKIN1-StubSNF1 (aPS) vonalak esetében. A StubGAL83 gátlása két vonal (aG1, aG6) esetében egyértelműen csökkentette a komplex aktivitását, míg a harmadik, az aG5 vonal három alkalommal lényegesen alacsonyabb, három alkalommal viszont lényegesen magasabb aktivitás értékket mutatott, mint a kontroll. Annak ellenére, hogy egy vonal reakciója eltérő volt, a másik kettő adatai alapján úgy gondoljuk, hogy a StubGAL83 a StubSNF1 pozitív regulátora. Ennek bizonyítására további aG vonalak vizsgálata van folyamatban. Az aG5 vonal már korábban is viselkedett másképp, mint a másik két vonal.

62

LOVAS (2003) kísérletei szerint az aG vonalak gyökérnövekedése, *in vitro*, időben visszamaradt a kontroll vonalakéhoz képest, de ez az aG5 vonalnál nem volt annyira jellemző, mint a másik két vonalnál. Az aG vonalak *in vitro* gumózása szintén elmaradt a kontrollétól, de az aG5 esetében ez sem volt akkora mértékű, mint például az aG6 esetében. A legvalószínűbb feltételezés, hogy az aG5 egy úgy nevezett mozaikos transzgénikus vonal. A beépült transzgén kópiaszáma vagy a beépülés helye is hozzájárulhat a nagy szóráshoz, például oly módon, hogy a transzgén egy olyan kromoszóma helyre épült be, ahol nagyobb a metilációs aktivitás, és ez kibe kapcsolja a transzgént.

A SAMS szubsztráttal a StubSNF1 és a PKIN1 aktivitását együttesen mérjük. Így a kettős antiszensz aPS vonalakban nem tudjuk pontosan, hogy a két SnRK1 közül melyik aktivitása mennyivel csökkent. Az aP és aS vonalak esetében, mivel célzottan egyik vagy másik SnRK1 volt gátolva, nagy biztonsággal mondhatjuk, hogy a gátolt enzim aktivitásának csökkenését mértük. Az aG vonalaknál, mivel a StubGAL83 csak a StubSNF1-gyel lép kapcsolatba, a PKIN1-gyel nem, feltételezzük, hogy a StubSNF1 aktivitása vagy a SAMS szubsztrát iránti affinitása csökkent. Nem zárhatjuk ki azonban, hogy az *Arabidopsis*-hoz hasonlóan (BOULY és mtsai, 1999), a burgonyában is létezik a StubGAL83-on kívül még egy vagy több β-alegység, amely(ek) a PKIN1-hez kapcsolódik(nak), és az aG vonalakban a StubGAL83-mal együtt gátlódik(nak), és így nemcsak az StubSNF1, de a PKIN1 komplex aktivitása vagy a SAMS szubsztráthoz való affinitása is csökken.

A különböző metabolikus útvonalak szabályozásában központi szerepet betöltő enzim komplex funkciójának részletes megismeréséhez elengedhetetlenül szükséges a kölcsönható fehérjék keresése és kapcsolatrendszerük feltárása. Ezért vizsgáltuk meg két burgonya enzim, a HMGR1 és a PK<sub>c</sub>, és a burgonya SnRK1-einek kapcsolatát élesztő két-hibrid rendszerben. A HMGR1 és a StubSNF1 interakciójának kimutatására irányuló kísérletek negatív eredményt mutattak. Ez azért volt meglepő számunkra, mert az emlősökben egyértelmű és jól jellemzett az AMPK-k és a HMGR fehérjék kapcsolata (HARDIE és mtsai, 1989), és nemcsak az SNF1 protein-kináz család tagjai mutatnak nagyfokú hasonlóságot, hanem az emlős HMGR foszforilálhatóságáért felelős szekvencia motívum a növényi HMGR-ekben is konzervált. DALE és mtsai (1995) be is bizonyították, hogy a karfiol SnRK1-e foszforiláció révén inaktiválja az *Arabidopsis* HMGR enzimét. Fontosnak tartjuk azonban megjegyezni, hogy ez a negatív eredménnyel záruló kísérletünk még nem bizonyítja egyértelműen azt, hogy a burgonyában nincs kapcsolat valamelyik SnRK1 és a HMGR között, hiszen a PKIN1-gyel nem végeztük el az ezirányú vizsgálatokat.

A PK<sub>c</sub>-val végzett kísérleteink bizonyítják, hogy a burgonya SnRK1-ek a PK<sub>c</sub>-val való kapcsolatukon keresztül is szabályozzák a szénhidrát metabolizmust. A növényi SnRK1-ek eddig

ismert célfehérjéi, azaz a HMGR, a SPS, és a NR mellé kísérleteink eredményeként felkerült a listára a PK<sub>c</sub> is, mint SnRK1 szubsztrát. TANG és mtsai (2003) fejlődő szója embriókban végzett kísérleteik alapján eddig csak feltételeztük, hogy a növényi SnRK1-ek részt vesznek a PK<sub>c</sub> poszttranszlációs szabályozásában. TANG és mtsai (2003) bizonyították, hogy a PK<sub>c</sub> foszforilációja ubiquitin-kötődés után proteaszómás lebontáshoz vezet, de csak feltételezték, hogy ezt a foszforilációt egy SnRK1 végzi. Mi élesztő két-hibrid kísérletekkel igazoltuk, hogy a burgonya két SnRK1-e kapcsolatba lép a burgonya PK<sub>c</sub>-jével és ehhez a kapcsolathoz feltétlenül szükséges a S<sup>500</sup> körüli régió jelenléte. Az S<sup>500</sup>-t körülvevő 13 aminosavból álló SAS-peptidet használva szubsztrátként Antal Ferenc nemrég kimutatta, hogy a StubSNF1 képes nemcsak a SAMS, de a PK<sub>c</sub> eredetű SAS-peptid foszforilálására is (dolgozatban nem szereplő kísérletek eredménye).

Az antiszensz PKIN1 és StubSNF1 burgonya növényekben megváltozik a PK aktivitás napi ciklusa a vad típushoz képest. Abban az esetben, amikor csak a PKIN1 gátolt (aP vonalak) a PK nappali alacsony aktivitású periódusa megnyúlik és a maximumot, a vad típushoz képest szignifikánsan magasabb értékkel és eltolva, 4 órával később, az éjszaka közepén éri el a PK a növényekben. A PK aktivitás éjszakai megemelkedése biztosítja azt a piruvát mennyiséget, aminek oxidációja során jön létre annak a NADPH<sub>2</sub>-nek és FADH<sub>2</sub>-nek a jelentős része, amelyeknek az oxidációja során képződik a sejt nem-fotoszintetikus úton keletkező ATP mennyiséget, ami szükséges ahhoz, hogy a növény biztosítsa – fotoszintézis hiányában, a terminális oxidáción keresztül - önmaga számára a folyamatos, megfelelő ATP-ellátottságot, és ezzel az optimális energiaállapotot. A vad típusú növényekben a kezdeti éjszakai csúcsot azonban egy enyhe visszaesés követi, míg azokban a növényekben, amelyekben a PKIN1 gátolva van, ez a visszaesés hiányzik, és a PK aktivitás jelentős emelkedése figyelhető meg. Lehet, hogy a PKIN1 funkciója éppen abban van, hogy megakadályozza a növény éjszakai "túlpörgését", a lebontó folyamatok túlzott működését.

Azokban a növényekben, amelyekben csak a StubSNF1 gátolt, a PK aktivitás napi változása alig volt kimutatható, a PK gyakorlatilag éjjel-nappal egy alacsony alapértéken működött, és elmaradt az éjszakai csúcs. Tehát mindkét SnRK1 befolyásolja a PK aktivitás napi ciklusát, de eltérő módon. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy mindkét SnRK1 a PK<sub>c</sub> azonos régiójához kötődik, ami a két enzimforma kompetíciójához vezet(het). Feltételezve, hogy előző következtetésünk helytálló, és a PKIN1 szerepe a PK aktivitás éjszakai csúcsának visszafogása, akkor az StubSNF1-gátolt növényekben a PKIN1 szabad működése okozhatja a PK aktivitás folyamatosan alacsony értékét. Ezzel szemben a StubSNF1 feladata a PK aktivitás növelése, és a

PKIN1 PK aktivitás csökkentő hatásának mérséklése, így biztosítva – számos más tényező mellett – a PK aktivitás normális napi ciklusát.

A PKIN1-StubSNF1 kettős antiszensz vonalak közül az aPS4 az aP növényekhez hasonlóan viselkedett, míg az aPS7-es vonal az aS vonalak fenotípusát mutatta. Ezek a fenotípusok jól korrelálnak a kisRNS és northern vizsgálatok eredményeivel (Sós-Hegedűs Anita és Antal Ferenc, személyes közlés). Az aPS7 vonalban a kisRNS és northern vizsgálatok azt mutatták, hogy csak a StubSNF1 gátlása volt sikeres, a PKIN1 mRNS mennyisége nem, vagy alig csökkent, és PKIN1 specifikus kisRNS-ek nem voltak kimutathatóak. Tehát nem meglepő, hogy a PKIN1 aktivitás jelenlétében az aPS7 vonalban a PK aktivitás folyamatosan alacsony szinten működött. Ugyanakkor az aPS4 vonalnál a kisRNS és northern vizsgálatok tanúsága szerint sikeres volt nemcsak a StubSNF1, de a PKIN1 gátlása is, megjelent mindkét specifikus kisRNS és mindkét mRNS mennyisége is jelentős mértékben csökkent. Vagyis érthető a kiugró éjszakai PK aktivitás csúcs, hiszen kevesebb PKIN1 volt jelen, hogy visszafogja a PK aktivitás éjszakai emelkedését.

Tovább bonyolítja a helyzetet az, hogy a burgonyában a PK aktivitást az SnRK1-ek transzkripciós szinten is szabályozhatják. Ismert, hogy a növényi SnRK1-ek számos gén expresszióját negatívan, vagy pozitívan befolyásolják, ahogyan azt a borsó (RADCHUK és mtsai, 2006) vagy az *Arabidobsis* (BAENA-GONZÁLEZ és mtsai, 2007) esetében már leírták. Előfordulhat, hogy a mi esetünkben is arról van szó, hogy egyik, vagy másik burgonya SnRK1 a transzkripció szintjén is befolyásolja a PK mennyiségét a növényben. Sós-Hegedűs Anita ezt a kérdést tisztázta és PK-specifikus próbával végzett northern analízissel kimutatta, hogy az StubSNF1, valószínűleg közvetetten, metabolikus áttételeken keresztül, transzkripciós szinten is befolyásolja a *PK*<sub>c</sub> megnyilvánulását.

Megállapítható tehát, hogy mindkét SnRK1 antiszensz gátlása befolyásolja a PK aktivitás periodicitását és intenzitását, de eltérő módon. Ezek az eredmények alátámasztják kutatócsoportunk korábbi megállapítását, miszerint a két SnRK1 szerepe eltér a burgonyában (LOVAS és mtsai, 2003).

#### 5.2. A StubGAL83 kapcsolódni tud a PVY vírus HcPro fehérjéjéhez

Dohány növényeken végzett kísérletekből kiderült, hogy két geminivírus fehérje, az AL2 és a L2 inaktiválja a dohány SnRK1-et (HAO és mtsai, 2003). A SnRK1 inaktivációja megnövekedett fogékonyságot váltott ki a különböző vírusfertőzésekre. A két vírusfehérje aminosav

szekvenciájának analízise során kiderült, hogy egyik sem tartalmaz SNF1 foszforilációs konszenzus szekvenciát, így a kapcsolat nem egy egyszerű kináz-szubsztrát kölcsönhatás.

A burgonya Y vírus funkcionálisan hasonló fehérjéje, a HcPro fehérje többfunkciós. Ismert, hogy egyik funkciója a géncsendesítés szupressziója, vagyis a növény védekezési folyamatának gátlása, a vírus-transzkripció és terjedés segítése. Noha a funkcionális hasonlóság nem párosul gyakorlatilag semmiféle szekvencia-homológiával, úgy gondoltuk, hogy talán működik a geminivírusokéhoz hasonló rendszer a PVY esetében is. Ebből kiindulva, célul tűztük ki a burgonya SnRK1-ei és a burgonya Y vírus HcPro fehérjéje között feltételezhetően létrejövő kapcsolat kimutatását és jellemzését.

Élesztő két-hibrid kísérletekkel vizsgáltuk a burgonya SnRK1 komplexei és a HcPro közötti interakciót. Eredményeink szerint a HcPro valóban kapcsolatba képes lépni az egyik SnRK1 komplexszel, azonban várakozásainkkal ellentétben, nem a katalitikus (StubSNF1), hanem az adaptor (StubGAL83) alegységgel. Mindez a különbség, a dohánnyal összehasonlítva, nem feltétlenül elképzelhetetlen, hiszen nemcsak másik növényfajról van szó, hanem egy másik csoportba tartozó vírusról is. A vizsgálatok akkor bizonyultak pozitívnak, ha a HcPro csaliként szerepelt az interakcióban és a StubGAL83 volt a préda. Ez a jelenség megfigyelhető volt a deléciós származékok esetében is. Kivételt csupán a Hc5 nevű forma jelentett, ami akkor is pozitív eredményt mutatott, ha a HcPro volt a préda. Ezt a jelenséget feltehetően az okozza, hogy az egyik két-hibrid vektorban, a pBD-Gal4-ben, expresszálódó fúziós fehérje, a GAL4 DNS-kötő domén-HcPro, olyan konformációt vesz fel, ami lehetetlenné teszi a StubGAL83-mal a kapcsolat létrejöttét. A HcPro deléciós származékainak vizsgálatával sikerült egy viszonylag szűk, 34 aminosav méretű szakaszra lokalizálni a kapcsolatért felelős régiót. A teljes hosszúságú HcPro 465 aminosavának ez 7,3%-a. HAO és mtsai (2003) az AL2 10%-ára, a L2 esetében pedig 7,4%ára lokalizálták a SNF1-gyel való interakcióért felelős régiót. Az általunk megadott szakasz és az AL2 illetve L2 megfelelő szakaszai között semmiféle egyezés vagy hasonlóság nincs. Összehasonlítva a HcPro ezen szakaszát más potyvírusok szekvenciáival hasonlóságot nem találtunk Az interakció részletesebb megismerése érdekében további kísérletek folynak azért, hogy a StubGAL83-on is megtaláljuk a kapcsolatért felelős szakaszt. Ha ez a szakasz megegyezik a StubSNF1-gyel való kapcsolódásért felelős régióval, akkor feltételezhetjük, hogy a vírus HcPro fehérjéje megakadályozza a komplex képződését, és ezáltal csökkenti a kináz aktivitást. Ha nem, akkor valamilyen más módon kell hatnia. Emellett szükség van a vírusfertőzött burgonya növények SnRK1 aktivitásának mérésére is, hogy lássuk, befolyásolja-e azt a vírus. Felmerülhet az a lehetőség is, hogy nem az aktivitást befolyásolja a HcPro, hanem a β-alegységen keresztül a komplex sejten belüli lokalizációjába, vagy a szubsztrát specificitásba szól bele, ezáltal módosítja a SnRK1 által irányított anyagcsere-útvonalakat a saját hasznára. A SnRK1 az ATP termelő anyagcsere útvonalakat aktiválja, ami egy általános stressz válasz is, hiszen a különböző stresszekre adott válaszok mind energiaigényes, ATP fogyasztó folyamatok. Lehet, hogy a vírus ezen a módon akadályozza a PTGS ATP igényes működését. Természetesen a replikációhoz a vírusnak is szüksége van ATP-re, de elképzelhető, hogy a SnRK1 útvonalak gátlásával a maradék ATP is elegendő számára.

Vírusfertőzési kísérletekkel próbáltuk megvizsgálni, hogy az antiszensz StubGAL83 növények másképpen reagálnak-e a PVY-nal való fertőzésre, mint a vad típus? Bár nagyok a szórások, kísérleteink azt valószínűsítik, hogy az aG6 fogékonyabb a vírusra, mint a vad típusú burgonya növények, a másik két megvizsgált vonal (aG1, aG5) nem, vagy épp ellenkezőleg, talán még ellenállóbb is valamivel. LOVAS és mtsai (2003) valamint SÓS-HEGEDŰS és mtsai (2005) vizsgálatai szerint az aG1 és az aG5 növényekben a StubGAL83 gátlás minden vizsgált szervben (levél, gyökér, gumó) egyöntetűen sikeres volt, míg az aG6 vonal esetében gátlás csak a levélben van. A levélben ugyan eltűnt a StubGAL83 mRNS és a specifikus kisRNS-ek is detektálhatóak voltak, a gyökérben és a gumóban azonban sem a mRNS mennyisége nem csökkent, sem kisRNS-ek nem voltak megfigyelhetőek. A vírusok szisztemikus terjedésére jellemző, hogy a növényi szervezetbe való bejutás után először a gyökérbe vándorol a vírus, és onnan terjed szét az egész növényben. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy mivel a harmadik növényvonalban (aG6) a gyökérben jelen volt a StubGAL83, a vírus képes volt a növény anyagcsereútjait úgy befolyásolni, hogy az neki kedvező volt a fertőzési folyamat kiteljesedése szempontjából. A kontrollhoz képest eltérően fejlődő aG6 vonal (lassúbb gyökérfejlődés, abnormális sejtek nagy száma a gyökérben, korai szeneszcencia) (LOVAS, 2003) ezek után már nem tudta a vírus szétterjedését gátolni a növényben. Azokban a vonalakban, amelyeknél a StubGAL83 gátlás minden szervükben egyöntetű volt (aG1, aG5), nem állt rendelkezésre a StubGAL83 a vírus HcPro-ja számára, így a növény anyagcseréjét nem tudta a saját érdekében megváltoztatni. Így a növény védekező mechanizmusai időben felállhattak, és lassabban terjedt a növényekben a vírus.

Lehetséges egy másik magyarázat is, ami az antiszensz gátlás eltérő molekuláris mechanizmusával függ össze. Az aG1-ben és aG5-ben a gátlás hőmérséklet-függőnek, míg az aG6-ban hőmérséklet-függetlennek bizonyult. Az aG1 és aG5 vonalban minden szervben megjelentek a kis RNS-ek, azonban ezek mennyisége alacsony (15°C) hőmérsékleten jelentősen kevesebb volt, míg az aG6 vonalban a csak levélben jelentkező gátlást a hőmérséklet nem befolyásolta (SÓS-HEGEDŰS és mtsai, 2005). Mivel a hőmérséklet szabályozását a rendelkezésünkre álló üvegházi körülmények között nem tudjuk megoldani, ennek következtében a hőmérsékletingadozással együtt változik a gátlás mértéke is. Ez a jelenség is

lehet magyarázata egyrészt a nagy szórásnak, másrészt az eltérő mechanizmusú gátlással rendelkező vonalaknál megfigyelt eltérő fogékonyságnak.

Bár nagyok a szórások, mégis úgy tűnik, hogy a vad típusú burgonya növények körülbelül felét megfertőzni képes víruskoncentráció a transzgénikus növény vonalak közül kettőt (aG1 és aG5) hasonló mértékben vagy annál kevésbé, egyet (aG6) pedig annál jobban fertőz. A fertőzési eredményeket (11. ábra) összevetve a SAMS-peptid foszforilációs aktivitási értékekkel (5. ábra), semmiféle összefüggést nem tudtunk felfedezni a kettő között. Az aG1 és az aG6 vonal enzimaktivitása, 10%-os szórással, egyaránt alacsonyabb, mint a vad típusé, mégis a vírusfertőzésre különbözőképpen reagál a két vonal. Ezzel szemben az aG5 vonal, amelyiknek SAMS-peptid foszforilációs aktivitása nagy szórást mutatott, két vírustesztben is lényegesen kevésbé, egyben pedig ugyanúgy fertőződött, mint a kontroll, és a vírustesztben mutatott 15%-os szórása pedig a legkisebb volt az aG vonalak között.

Feltételezzük, hogy a vírustesztben kapott eredmények magyarázatát nem a levelek SnRK1 aktivitásának csökkenésében, hanem az antiszensz gátlás típusában kell keresnünk. Az első két vonalnál (aG1 és aG5) az antiszensz gátlás – a northern és a siRNS vizsgálatok szerint –, minden vizsgált szervben (levél, gyökér, gumó) egyöntetűen sikeres volt (SÓS-HEGEDŰS és mtsai, 2005). Az aG6 vonal esetében azonban a levélben ugyan eltűnt a StubGAL83 mRNS, és a specifikus siRNS-ek detektálhatóak voltak, a gyökérben és a gumóban azonban sem a mRNS mennyisége nem csökkent, sem siRNS-ek nem voltak kimutathatók. A vírusok szisztemikus terjedésére jellemző, hogy a növényi szervezetbe való bejutás után a gyökérben szaporodik fel először a vírus, és onnan terjed szét az egész növényben. Ha a vírus a StubGAL83-on keresztül próbálja befolyásolni a növény anyagcseréjét, akkor azokban a vonalakban (aG1 és aG5), amelyeknél a StubGAL83-at a levélben és gyökérben egyaránt sikeresen gátoltuk, ez a stratégia nem tud kibontakozni a StubGAL83 hiányában. Az aG6 vonalnál azonban a StubGAL83 ugyanúgy jelen van a gyökérben, mint a vad típusban, így tehát a vírus ezt a támadási pontot is kihasználhatja. Mindez azonban még nem ad magyarázatot arra, hogy miért betegedett meg két kísérletben is az aG6 vonal még nagyobb arányban, mint a vad típus. A StubGAL83-gátolt vonalaknak a gyökér- és gumófejlődése lassúbb, mint a kontrollé, a gyökér sejtjeinek 46%-a abnormális, szemben a kontrollban található 10%-kal (LOVAS és mtsai, 2003) Ezen kívül az aG növények még korai szeneszcenciát is mutatnak (TOLDI és mtsai, nem publikált adat). Úgy gondoljuk tehát, hogy mindezek együttesen okozhatják az aG6 vonal nagyobb vírusfogékonyságát. A jelenség egy másik lehetséges magyarázatával a Következtetések fejezetben foglalkozunk.

# 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A burgonya a negyedik legfontosabb kultúrnövényünk. A burgonya gumóját nagy keményítő-, jó biológiai értékű fehérje- és gazdag vitamintartalma teszi fontos népélelmezési cikké. A gumófejlődés legjellegzetesebb folyamata a nagy mennyiségű szénhidrát felhalmozódása. A szénhidrát-anyagcsere szabályozásának kulcsenzime a SNF1 kináz komplex. Működésének részletes megismerése fontos feladat. Munkánk célja volt a burgonya két SNF1-rokon kináz komplexének (SnRK1-nek), a PKIN1-nek és a StubSNF1-nek a vizsgálata, a PKIN1 és StubSNF1 katalitikus alegységekben, valamint a StubSNF1 komplex összekötő alegységében, a StubGAL83-ban gátolt, antiszensz transzgénikus növények kináz aktivitásának megismerése, a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában betöltött szerepük vizsgálata, a piruvát-kináz enzimmel való kapcsolatuk feltárása.

Számítógépes szekvencia elemzéssel számos növényi enzimen találhatunk SnRK1 felismerő és foszforilációs konszenzus szekvenciát. Mi ezek közül a piruvát-kináz citoszolikus formájának, a PK<sub>c</sub>-nek, és a burgonya SnRK1-einek kapcsolatát vizsgáltuk részletesen. Kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a burgonyában található mindkét SnRK1 kapcsolatba lép a PK<sub>c</sub>-n található S<sup>500</sup> körüli régióval.

Antiszensz StubSNF1 (aS), PKIN1 (aP), StubSNF1-PKIN1 (aPS) és StubGAL83 (aG) burgonya növények SnRK1 aktivitásának mérésével igazoltuk, hogy a gátlás hatása, az RNS mennyiség csökkenése mellett, az enzimaktivitás csökkenésében is megnyilvánul. Így alátámasztást nyert csoportunknak az a korábbi feltételezése, miszerint a StubGAL83 a StubSNF1 pozitív regulátora. A transzgénikus burgonya növények PK aktivitásának napi ciklusát nyomon követve megállapítottuk, hogy, bár eltérő módon, de mind a PKIN1, mind a StubSNF1 gátlása hatással van a PK aktivitás cirkadian ritmusára. A két SnRK1 szerepe tehát nem teljesen azonos.

A burgonya kultúrák egyik legveszedelmesebb kórokozója a PVY. A PVY HcPro fehérjéjéről tudjuk, hogy a növények vírusok elleni védekezésének kijátszásában is szerepe van. A geminivírusok HcPro-hoz hasonló funkciójú fehérjéi képesek inaktiválni a dohány SnRK1-ét és ezzel a vírusfogékonyság növekedését okozzák. Feltételeztük, hogy létezik egy hasonló mechanizmus a PVY esetében is. Élesztő két-hibrid kísérletekkel igazoltuk is a PVY HcPro és a StubGAL83 kapcsolatát. A HcPro deléciós származékaival leszűkítettük azt a régiót, ami feltétlenül szükséges a kapcsolat létrejöttéhez. Az antiszensz StubGAL83 növények vírusfertőzésével igyekeztünk megállapítani, hogy a detektált kapcsolatnak van-e valami hatása a

69

vírus fertőzési folyamatára. Három StubGAL83-gátolt vonalat vizsgáltunk. Előzetes eredményeink alapján az egyik vonal fogékonyabb, míg a másik két vonal, éppen ellenkezőleg, még ellenállóbb a PVY fertőzéssel szemben, mint a vad típusú kontroll. Az ellentmondásos eredmények miatt ezt a kérdést több aG vonal bevonásával, nagyobb egyedszámban és több párhuzamosban jelenleg is vizsgálja a csoport.

#### 7. SUMMARY

Potato is the fourth among our most important cultivated food plants. The high starch content, the biological value of the proteins and the vitamin content of the tubers render the potato to be staple food. The most characteristic element of the tuber development is the accumulation of carbohydrates. The key enzyme of the carbohydrate-metabolism regulation is the SNF1 kinase complex. Therefore, the detailed knowledge of its functioning is of great importance. The aim of our work was to measure the total activity of PKIN1 and StubSNF1, the two SNF1-related kinase complexes of potato, also in the antisense transgenic plants repressed in the catalitic subunits, and the anchoring subunit of the StubSNF1 complex, StubGAL83, in order to study their role in the regulation of the carbohydrate-metabolism, and to reveal their possible interaction with the pyruvate-kinase enzyme.

Using computer assisted sequence analysis SnRK1 recognition and phosphorylation consensus sequences can be found in a number of plant enzymes. Out of them the cytosolic isoform of the pyruvate kinase,  $PK_c$ , has been thoroughly investigated in our experiments. It was found that both SnRK1s of potato interact with the region surrounding  $S^{500}$  in  $PK_c$ .

Measuring the SnRK1 activity of antisense StubSNF1 (aS), PKIN1 (aP), StubSNF1-PKIN1 (aPS) and StubGAL83 (aG) potato plants it was shown that the effect of inhibition was expressed not only at RNA, but also at enzyme activity level. Moreover, the results supported our previous conclusion that the StubGAL83 is a positive regulator of the StubSNF1 activity. It was found that the daily cycle of the PK activity of the transgenic potato plants was influenced by the inhibition of SnRK1s, however, in a different way. This result indicates that the function of the two SnRK1s of potato is not identical.

One of the most important plant pathogen of the potato plant is the potato virus Y (PVY). It is known that the PVY HcPro protein has an important role in outwitting the plant defence against viruses. Proteins of similar function in geminiviruses are able to inactivate the SnRK1 in tobacco plant, and increase the susceptibility of plants to viruses. We assumed that a similar mechanism exists in PVY infection. In yeast two-hybrid experiments the interaction of PVY HcPro and StubGAL83 was detected. Isolating and using deletion derivatives of PVY HcPro, the region absolutely necessary for the detected interaction was determined. Inoculating the antisense StubGAL83 plants with PVY we tried to find out whether the revealed interaction has an influence on the process of infection or not. Three StubGAL83-repressed lines were investigated. One antisense line showed higher susceptibility, while two lines showed higher

resistance than the wild type plants. However, these results need to be confirmed. Investigations of several aG lines in more parallels are in progress.
### 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. USA*, 88, 8602-8605. p.

AHLQUIST, P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, 296, 1270 – 1273. p.

ALEPUZ, P.M., CUNNINGHAM, K.W., ESTRUCH, F. (1997): Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol. Microbiol.* 26, 91-98. p.

ANDRE, C., BENNING, C. (2007): Arabidopsis seedlings deficient in a plastidic pyruvate kinase are unable to utilize seed storage compounds for germination and establishment. *Plant Physiol.* 145, 1670-1680. p.

ANDRE, C., FROELICH, J.E., MOLL, M.R., BENNING, C. (2007): A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil byosynthesis in Arabidopsis. *Pl. Cell*, 19, 2006-2022. p.

ATREYA, C.D., PIRONE, T.P. (1993): Mutational analysis of the helper-cmponenet proteinase gene of a potyvirus: effect of amino acid substitutions, deletions and gene replecement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11919-11223. p.

BAENA-GONZÁLEZ, E., SHEEN, J. (2008): Convergent energy and stress signalling. *Trends Pl. Sci.*, 13, 474-482. 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, 938-943. p.

BARI, L. de, VALENTI, D., PIZZUTO, R., ATLANTE, A., PASSARELLA, S. (2007): Phosphoenolpyruvate metabolism in Jerusalem artichoke mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 281–294. p.

BARNA B. (1998): A kórokozó és a növény kölcsönhatása. In: ÉRSEK T., GÁBORJÁNYI R. (szerk.): Növénykórokozó mikroorganizmusok. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 13-44.

BASS, B.L. (2000): Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238. p.

BAUD, S., WUILLEME, S., DUBREUCQ, B., DE ALMEIDA, A., VUAGNAT, C., LEPINIEC, L., MIQUEL, M. ROCHAT, C. (2007): Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.*, 52, 405-419.

BECZNER, L., HORVÁTH, J., ROMHÁNYI, I., FÖRSTER, H. (1984): Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.* 27, 339-352. p.

BEG, Z.H., STONIK, J.A., BREWER, H.B. Jr. (1978): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorilation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3678-3682. p.

BHALERAO R.P., SALCHERT K., BAKÓ L., ÖKRÉSZ L., SZABADOS L., MURANAKA T., MACHIDA Y., SHELL J. AND KONCZ C. (1999): Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5322-5327. p.

BIRCH, R.G. (1997): Plant transformation: problems und strategies for practical application. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.*, 48, 297-326. p.

BOULY, J.P., GISSOT, L. LESSARD, P-. KREIS, M.,THOMAS,M. (1999): Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SÍP and SNF4 interact wih AKINα1, an 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 utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry* 72, 248-254. p.

BRADFORD, K.J., DOWNIE, A.B., GEE, O.H., ALVARADO, V., YANG, H., DAHAL, P. (2003): Abscisic acid and biggerellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-realted kinase complex in tomato seeds. *Pl. Physiol.*, 132, 1560-1576. p.

BURELL M.M., MOONEY P.J., BLUNDY M., CARTER D., WILSON F., GREEN J., BLUNDY K.S., REES T. (1994): Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* 194, 95-101. p.

CARLING, D., CLARKE, P.R., ZAMMIT, V.A., HARDIE, D.G. (1989): Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur. J. Biochem.* 186, 129-136. p.

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

CARRINGTON, J.C., FREED, D.D. OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing, *EMBO J.* **9** (1990), pp. 1347–1353. 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.

CELOTTO, A.M., GRAVELEY, B.R. (2002): Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA*, 8, 8-24. p.

CHAPMAN, E.J., PROKHNEVSKY, A.I., GOPINATH, K., DOLJA, V.,V., CARRINGTON, J.C. (2004): Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development*, 18, 1179-1186. p.

CHENG, Y-Q., LIU, Z-M., XU, J., ZHOU, T., WANG, M., CHEN, Y-T., LI, H-F., FAN, Z-F. (2008): HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *J. Gen. Virol.*, 89, 2046-2054.

CHIU, Y.-L., RANA, T.M. (2002): RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell*, 10, 549-561. p.

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

CRAWFORD, R.M., HALFORD, N.G., HARDIE, D.G. (2001): Cloning of DNA encoding a catalytic subunit of SNF1-related kinase-1 (SnRK1-α1), and immunological analysis of multiple forms of the kinase, in spinach leaf. *Plant Mol. Biol.* 45, 731-741. p.

DALE, S., ARRÓ, M., BECERRA, B., MORRICE, N.G., BORONAT, A., HARDIE, D.G., FERRER, A. (1995): Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana* and its inactivation by phosphorylation at serine-577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase kinase. *Eur. J. Biochem.* 233, 506-513. p.

DALMAY, T., HAMILTON, A., RUDD, S., ANGELL, S., BAULCOMBE, D.C. (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but by a virus. *Cell*, 101, 543-553. p.

DAVIES S.P., CARLING D. AND HARDIE D.G. (1989): Tissue distribution of the AMPactivated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *European Journal of Biochemistry* 186, 123-128. p.

DE BLOCK, M. (1993): The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects, and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, 71, 1-14. p.

DE BOKX, J.A., HUTTINGA, H. (1981): Potato virus Y. Description of plant viruses, No. 242. *Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol.*, Kew, UK.

DI SERIO F., SCHÖB H., IGLESIAS A., TARINA C., BOULDOIRES E. AND 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. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 98, 6506-6510. p.

EAMENS A., WANG M.B., SMITH A.N., WATERHOUS P.M. (2008): RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Pl. Physiol.*, 147, 456-468. p.

FARKAS G. (1984): Növényi biokémia. Akadémiai Kiadó, Budapest, 130-213.pp.

FARRÁS, R., FERRANDO, A., JÁSIK, J., KLEINOW., T., ÖKRÉSZ, L., TIBURCIO, A., SALCHERT, K., DEL POZO, C., SCHELL, J., KONCZ, C. (2001): SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. EMBO J., 20, 2742-2756. p.

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

FERRER, A., CAELLES, C., MASSOT, N., HEGARDT, F.G. (1985): Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5<sup>-</sup> monophosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132, 497-504. p.

FORETZ, M., CARLING, D., GUICHARD, C., FERRE, P., FOUFELLE, F. (1998): AMPactivated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 14767-14771. p.

GÁBORJÁNYI R. (1998): Vírusok. In: ÉRSEK T., GÁBORJÁNYI R. (szerk.): Növénykórokozó mikroorganizmusok. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 61-92. pp.

GÁBORJÁNYI R. (1999): Vírusok. In: HORNOK L. (szerk.): Bevezetés a mikrobiológiába. Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar. Egyetemi jegyzetpótló. Gödöllő, 17-38. pp. GEIGENBERGER, P., GEIGER, M. STITT, M. (1998): High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-glucose pyro-phosphorylase by decreased levels of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers. *Pl. Physiol.*, 117, 1307-1316. p.

GIETZ, R.D., WOODS, R.A. (1994): High efficiency transformation in yeasts. (Invited book chapter). In: JOHNSTON, J.A. (ed.): Molecular genetics of yeast: Practical approaches. Oxford University Press. 121-134. pp.

GIVAN, C.V. (1999): Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 74, 227-309. p.

GOTTLOB-McHUGH S.G., SANGWAN R.S., BLAKELEY S.D., VANLERBERGHE G.C., KO K., TURPIN D.H., PLAXTON W.C., MIKI B.L., DENNIS D.T. (1992): Normal growth of transgenic tobacco plants in the absence of cytosolic pyruvate kinase. *Plant Physiology* 100, 820-825. p.

GRODZINSKI, B., JIAO, J., KNOWLES, V.L., PLAXTON, W.C. (1999): Photosynthesis and carbon partitioning in transgenic tobacco plants deficient in leaf cytosolic pyruvate kinase. *Pl. Phyisol.*, 120, 887-895. p.

HALFORD N.G., HARDIE D.G. (1998): SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* 37, 735-748. p.

HALFORD, N.G., VICENTE-CARBAJOSA, J., GABELLI, P.A., SHEWRY, P.R., HANNAPEL, U., KREIS, M. (1992): Molecular analyses of a barley multigene family homologous to the yeast protein kinase gene SNF1. Plant J., 2, 791-797. p.

HANAHAN D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580. p.

HANKS S.K., HUNTER T., (1995): The eukaryotic protein kinase superfamily. In: Hardie G., Hanks S., (eds) The Protein Kinase Factsbook, Academic Press, London, Vol I, 7-47. p. HANNAPEPPEL, U., VICENTE-CARBAJOSA, J., BARKER, J.H.A., SHEWRY, P.R., HALFORD, N.G. (1995): Differential expression of two barley SNF1-related protein kinase genes. Plant Mol. Biol., 27, 1235-1240. p.

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

HARDIE, D. G., HAWLEY, S.A. (2001): AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssay* 23, 1112-1119. p.

HARDIE, D.G., SAKAMOTO, K. (2006): AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21, 48-60. p.

HARDIE, D. G., CARLING, D., SIM, A.T.R. (1989): The AMP-activated protein-kinase – a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 14, 20-23. p.

HARDIE, D. G., CARLING, D., CARLSON, M. (1998): The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821-855. p.

HARDY, T.A., HUANG, D., ROACH, P.J. (1994): Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases int he control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 27907-27913. p.

HAWKES J.G. (1994): Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato genetics* (Bradshaw J. E. and Mackay G. R. ads.). Wallingford: CAB INTERNATIONAL. 3-43. p.

HOLLINGSWORTH, R., WHITE, J.H. (2004): Target discovery using yeast two-hybrid system. DDT:Targets, 3, 97-103. 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. USA*, 100, 8839-8843. p.

HU, Z.-H., PLAXTON, W.C. (1996): Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from leaves of the castor oil plant. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 298-307. p.

HUTTLY, A.K., PHILLIPS, A.L. (1995): Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. Plant Mol. Biol. 27, 1043-1052. p.

HUTVÁGNER, G., ZAMORE, P.D. (2002): RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 12, 225-232. p.

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

KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (1998): A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95, 461-470. p.

KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (2001): Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology*, 285, 71-81. p.

KASSCHAU, K.D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E.J., KRIZAN, K.A., CARRINGTON, J.C. (2003): P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4, 205–217. p.

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

KNOWLES, V.L., MCHUGH, S.G., HU, Z., DENNIS, D.T., MIKI, B.L., PLAXTON, W.C. (1998): Altered growth of transgenic tobacco lacking leaf cytosolic pyruvate kinase. *Pl. Physiol.*, 116, 45-51. p.

KOBR, J., BEEVERS, H. (1971): Gluconeogenesis in the castor bean endosperm. I. Changes in glycolytic intermediates. *Pl. Physiol.* 47, 48-52. p.

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

LAKATOS L., KLEIN M., HÖFGEN R., BÁNFALVI ZS. (1999): Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant Journal*, 5, 569-574. p.

LAKATOS, L., CSORBA, T., PANTALEO, V., CHAPMAN, E.J., CARRINGTON, J.C., LIU, Y-P., DOLJA, V.V., CALVINO, L.f., LÓPEZ-MOYA, J.J., BURGYÁN, J. (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO*, 25, 2768-2780. p.

LECLERC, I., KHAN, A., DOIRON, B. (1998): The 5'-AMP—activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett.*, 431, 180-184. p.

LE GUEN, L., THOMAS, M., BIANCHI, M., HALFORD, N.G., KREIS, M. (1992): Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene*, 120, 249-254. p.

LEISER, R-M., RICHTER, J. (1978): Reinigung und einige Eigenschaften des Kartoffel-Y-Virus. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, 14, 337-350. p.

LESAGE, P., YANG, X., CARLSON, M. (1994): Analysis of the SIP3 protein identified in a two-hybrid screen for interaction with the SNF1 protein kinase. *Nucl. Acids Res.*, 22, 597-603. p.

LI, W.X., DING, S.W. (2001): Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotech.* 12 (2), 150-154. p.

LLAVE, C., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (2000): Virus-encoded supressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step int he silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13401-13406. p.

LLAVE, C., KASSCHAU, K.D., RECTOR, M.A., CARRINGTON, J.C. (2002): Endogeneous and silencing-associated small RNA sin plants. *Plant Cell*, 14, 1605-1619. p.

LO, W.-S., DUGGAN, L., EMRE, N.C.T., BELOTSERKOVSKYA, R., LANE, W.S., SHIEKHATTER, R., BERGER, S. (2001): SNF1, a histone kinase thet 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. *Analytical Biochemistry* 163, 16-20. p.

LOVAS Á. (2003): A burgonya SNF1 protein-kináz komplex funkcionális jellemzése. Doktori értekezés. *Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Természettudományi Kar, Budapest*.

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

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

MACKINTOSH, R.W., DAVIES, S.P., CLARKE, P.R., WEEKES, J., GILLESPIE, J.G., GIBB, B.J., HARDIE, D.G. (1992): Evidence for a protein kinase cascade in higher plants: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur. J. Biochem.* 219, 923-931. p.

MALLORY, A.C., ELY, L., SMITH, T.H., MARATHE, R., ANANDALAKSHMI, R., FAGARD, M. ...et al....(2001): HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. Plant Cell, 13, 571-584. p.

MAN A.L., PURCELL P.C., HANNAPPEL U., HALFORD N.G. (1997): Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptid kinase activity measurements. *Plant Molecular Biology* 34, 31-43. p.

MARCHLER-BAUER, A., PANCHENKO, A.R., SHOEMAKER, B.A., THIESSEN, P.A., GEER, L.Y., BRYANT, S.H. (2002): CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. Nucleic Acid Res. 30, 81-283. 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. *Pl. Biotechn. J.*, 4, 409-418. p.

MÉRAI, ZS., KERÉNYI, Z., KERTÉSZ, S., MAGNA, M., LAKATOS, L., SILHAVY, D. (2006): Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virology*, 80, 5747-5756. p.

MLOTSHWA, S., VERVER, J., SITHOLE-NIANG, I., PRINS, M., VAN KAMMEN, A., WELLINK, J. (2002): Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes*, 25, 45-57. p.

MONGER, W.A., THOMAS, T.H., PURCELL, P.C., HALFORD, N.G. (1997): Identification of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Growth Regul.*, 22, 181-188. p.

MURANAKA T., BANNO H. AND MACHIDA Y., (1994): Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 14, 2958-2965. p.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497. p.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990): Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2, 279-289. p.

NÉMETH, K., SALCHERT, K., PUTNOKY, P., BHALERAO, R., KONCZ-KÁLMÁN, Z., STANKOVIC-STANGELAND, B., BAKÓ, L., MATHUR, J., ÖKRÉSZ, L., STUBEL, S., GEIGENBERGER, P., STITT, M., RÉDEI, M., SCHELL, J., KONCZ, C. (1998): Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein in *Arabidopsis. Genes Dev.*, 10, 3059-3073. p.

OLIVER, N.S.,M LUNN, J.E., URBANCZYK-WOCHNIAK, E., LYTOVCHENKO, A., VAN DONGEN, J.T., FAIX, B., SCHMÄLZLIN, E., FERNIE, A.R., GEIGENBERGER, P. (2008): Decreased expression of cytosolic pyruvate kinase in potato tubers leads to a decline in pyruvate resulting in and in vivo repression of the alternative oxidase. *Plant Physiol.*, 148, 1640-1654. p.

PIEN, S., WYRZYKOWSKA, J., FLEMING, A.J. (2001): Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. *Plant J.* 25, 663-674. p.

PILKIS, S.J., GRANNER, D.K. (1992): Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann. Rev. Physiol.* 54, 885-909. p.

PLAXTON, W.C. (1989): Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isoenzymes from castor-oil plant endosperm and leaf. *Eur. J. Biochem.* 181, 443-451. p.

PLAXTON, W.C. (1996): The organization and regulation of plant glycolysis. Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol. 47, 185-214. p.

PLAXTON, W.C., PODESTA, F.E. (2006): The functional organization and control of plant respiration. *Crit. Rev. Pl. Sci.*, 25, 159-198. p.

PLAXTON, W.C., DENNIS, D.T., KNOWLES, V.,. (1990): Purification of leucoplast pyruvate kinase from developing castor bean endosperm. *Pl. Physiol.* 94, 1528-1534. p.

PLAXTON, W.C., SMITH, C.R., KNOWLES, V.L. (2002): Molecular and regulatory properties of leucoplast pyruvate kinase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cells. *Arch. Biochem Biophys.*, 400, 54-62. p.

PODESTA, F.E., PLAXTON, W.C. (1991): Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem. J.*, 279, 495-501. p.

PODESTA, F.E., PLAXTON, W.C. (1992): Plant cytosolic pyruvate kinase: a kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160, 213-220. p. PODESTA, F.E., PLAXTON, W.C. (1993): Activation of cytosolic pyruvate kinase by polyethylene glycol. *Pl. Physiol.*, 103, 285-288. p.

PODESTA, F.E., PLAXTON, W.C. (1994): Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphor-*enol*pyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta*, 194, 381-387. p.

POLGE, C., THOMAS, M. (2006): SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in Plant Science*, 12, (1), 20-28. 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.

RADCHUK, R., RADCHUK, V., WESCHKE, W., BORISJUK, L., WEBER, H. (2006): Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acidinsensitive phenotype. Pl. Phyiol., 140, 263-278. p.

RUBENSTEIN, E.M. (2008): Glucose sensing and the regulation of the AMP-activated protein kinase in yeast. PhD Thesis, University of Pittsburgh.

SALCHERT, K., BHALERAO, R., KONCZ-KÁLMÁN, Z., KONCZ, C. (1998): Control of cell elongation and stress responses by steroid hormones and carbon catabolic repression in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 1517-1520. p.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989): Molecular Cloning: A laboratory manual, Ed 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHEIBE W.-R., KRAPP A., AND STITT M. (2000): Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxilase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase exxpression regulate organic acid metabolism during nnitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ.* 23, 1155-1167. p.

SCHWACHTJE, J., MINCHIN, P.E.H., JAHNKE, S., VAN DONGENS, J.T., SCHITTKO, U., BALDWIN, I.T. (2006): SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS*, 103, 12935-12940. p.

SCHWENDER, J., OHLROGGE, J.B., SACHAR-HILL, Y. (2004): Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr. Opin. P. Biol.*, 7, 309-317. p.

SHAMS-BAKHSH, M., CANTO, T., PALUKAITIS, P. (2007): Enhanced resistance and neutrilazition of defense responses by suppressors of RNA silencing. *Virus Res.*, 130, 103-109. p.

SHEPHERD, D.N., MARTIN, D.P., THOMSON, J.A. (2009): Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Pl. Science*, 176, 1-11. p.

SIEGVALD, R. (1984): The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y<sup>o</sup> (PPV<sup>o</sup>). *Potato Res.*, 27, 285-290. p.

SIMON, M., BINDER, M., ADAM, G., HARTIG, A., RUIS, H. (1992): Control of peroxisome proliferation in Saccharomyces cerevisias by ADR1, SNF1 (CAT1, CCR1) and SNF4 (CAT3). *Yeast*, 4, 303-309. p.

SIMÓN-MATEO, C., LÓPEZ-MOYA, J.J., GUO, H.S., GONZÁLEZ, E., GARCIA, J.A. (2003): Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *J.Gen. Virol.*, 84, 2877-2883. p.

SMITH, C.R., KNOWLES, V.L., PLAXTON, W.C. (2000a): Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from Brassica napus (rapeseed) suspension cell cultures. Implications for the integration of glycolyis with nitrogen assimilation. Eur. *J. Biochem.* 267, 4477-4485. p.

SMITH, N.A., SINGH, S.P., WANG, M.B., STOUTJESDIJK, P., GREEN, A., WATERHOUSE, P.M. (2000b): Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407, 319-320. p.

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

STIEKEMA W.J., HEIDEKAMP F., DIRKSE W.G., VAN BECKUM J., DE HAAN P., TEN BOSH C., LOUWERSE J.D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Pl. Mol. Biol.*, 11, 255-269. p.

STONE J.M., AND WALKER J.C. (1995):Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction. *Plant Physiology* 108, 451-457. p.

SUGDEN C., DONAGHY P.G., HALFORD N.G. AND HARDIE D.G. (1999a): Two SNF1related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzim A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol.*, 120, 257-274. p.

SUGDEN, C., CRAWFORD, R.M., HALFORD, N.G., HARDIE, D.G. (1999B): Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5<sup>,</sup>-AMP. *Plant J.*, 19, 433-439. p.

SUNTER, G., SUNTER, J., BISARO, D.M. (2001): Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology*, 285, 59-70. p.

SWANEY, S., POWERS, H., GOODWIN, J., ROSALES, L.S., DOUGHERTY, W.G. (1995): RNA-mediated resistance with non-structural genes from the tobacco etch virus genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8 (6), 1004-1011. p.

SZIRMAI, J. (1958): A burgonya Y-vírusának érbarnulást okozó törzse dohánykultúrákban. Növénytermelés, 7, 341-350. p.

SYLLER, J. (2006): The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.*, 67, 119-130. p.

TAMAI, K.T., LIU, X., SILAR, P., SOSINOWSKI, T., THIELE, D.J. (1994): Heat shock transcription factor activities yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8155-8165. p.

TANG G.Q., HARDIN S.C., DEWEY R., HUBER S.C. (2003a): A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant Journal* 34, 77-93. p.

TANG, G., REINHART, B.J., BARTEL, D.P., ZAMORE, P.D. (2003b): A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, 17, 49–63. p.

TEUSINK, B., PASSARGE, J., REIJENGA, C.A., ESGALHAD, E., VAN DER WEIJDEN, C.C., SCHEPPER, M., WALSH, M.C., BAKKER, B.M., VAN DAM, K., WESTERHOFF, H.V., SNOEP, J.L. (2000): Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5313-5329. p.

THOMAS, S., MOONEY, P.J.F., BURRELL, M.M., FELL, D.A. (1997): Metabolic control analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*) explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem. J.* 322, 119-127. p.

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

TURNER W.L., PLAXTON W.C. (2000): Purification characterization of cytosolic pyruvate kinase from banana fruit. *Biochemical Journal* 352, 875-882. p.

TURNER, W.L., KNOWLES, V.L., PLAXTON, W.C. (2005): Cytosolic pyíruvate kinase: subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. *Planta*, 222, 1051-1062. p.

TRUMBLY, R.J. (1992): Glucose repression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol. 6, 15-21. p. VANITHARANI, R., CHELLAPAN, P., FAUQUET, C. (2005): Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 10, 144-151. p.

VERVLIET G., HOLSTERS M., TEACHY H., VAN MONTAGU M., SCHELL J. (1975) Characterisation of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *The Journal of General Virology* 26, 33-48. p.

VINCENT, O., CARLSON, M. (1999): Gal83 mediates the interaction of the SNF1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.*, 18, 6672-6681. p.

VINCENT, O., TOWNLEY, R., KUCHIN, S., CARLSON, M. (2001): Subcellular localization of the SNF1 kinase is regulated by specific  $\beta$  subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.*, 15, 1104-1114. p.

VOINNET, O., PINTO, Y.M., BAULCOMBE, D. (1999): Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *PNAS*, 96, 14147-14252. p.

WANG, H., HAO, L., SHUNG, C-Y., SUNTER, G., BISARO, D.M. (2003): Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant Cell*, 15, 3020-3032. p.

WESLEY, S.V., HELLIVELL, C.A., SMITH, N.A., WANG, M.B., ROUSE, D.T., LIU, Q., GOODING, P.S., SINGH, S.P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P.A., ROBINSON, S.P., GLEAVE, A.P., GREEN, A.G., WATERHOUSE, P.M. (2001): Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581-590. p.

WHITE, J.L., KAPER, J.M. (1989): A simple method for detection of viral satellite RNA in small tissue samples. *J. Virol. Methods*, 23, 83-94. p.

WOODS, A., MUNDAY, M.R., SCOTT, J., YANG, X.L., CARLSON, M., CARLING, D. (1994): Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 269, 19509-19519. p.

http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT3024-1.pdf

http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/media.html

http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html

http://kkvka.georgikon.pate.hu/tech/burgonya.htm

# M2. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### Szakcikkek folyóiratokban

DÓCZI, R., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., **BECZNER, F.,** BÁNFALVI, ZS. (2005): Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in solanaceous species. Plnat Physiology and Biochemistry, 43 (3), 269-276. IF: 1.414

**BECZNER F.**, DANCS G., SÓS-HEGEDŰS A., ANTAL F., BÁNFALVI Z. (2010): Interaction between SNF1-related kinases and a cytosolic pyruvate kinase of potato. Journal of Plant Physiology, 167(13):1046-1051 IF: 2.85

**BECZNER F.**, ANTAL F. ÉS BÁNFALVI ZS. (2010): A burgonya Y vírus Hc-Pro és a burgonya Stubgal83 fehérjéjének kapcsolata. Növényvédelem, 46 (5): 226-232.

### Konferencia kiadványok

**BECZNER F.**, BÁNFALVI ZS. (2006): A burgonya SNF1 protein-kináz komplexe és kapcsolata más fehérjékkel. Tavaszi Szél, 2006. május 4-7. Kaposvár. Konferenciakiadvány, Doktoranduszok Országos Szövetsége, pp. 10-13.

Tudományos intézetben tartott szakmai eliadások

**BECZNER F.**, BÁNFALVI ZS. (2006): A burgonya SNF1 protein-kináz komplexe és kapcsolata más fehérjékkel. Tavaszi Szél, 2006. május 4-7.

**BECZNER F.**, LOVAS Á., SÓS-HEGEDŰS A., PALKOVICS L., BÁNFALVI Z.(2005): Az SNF1 kináz komplex szerepe burgonyában. MBK Napok 2005., Gödöllő, 2005. december 12-13.

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

**BECZNER F.**, DANCS G., SÓS-HEGEDŰS A., ANTAL F., BÁNFALVI ZS. (2008): A burgonya SNF1-rokon kinázainak hatása a piruvát-kináz aktivitására. MBK Napok 2008., Gödöllő, 2008. november 17-18.

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

### Konferencia összefoglalók (poszterek)

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, március 12, Összefoglaló 104. old.

**BECZNER F.**, DANCS G., ANTAL F., SÓS-HEGEDŰS A., BÁNFALVI ZS. (2008): A burgonya SnRK1 komplexei és a piruvát-kináz aktivitás közötti kapcsolat vizsgálata. XIV. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, március 12, Összefoglaló 22. old.

**BECZNER F.**, DANCS G., SÓS-HEGEDŰS A., ANTAL F., BÁNFALVI ZS. (2009): A burgonya SNF1-rokon kinázai a citoszolikus piruvát-kináz regulátorai. Biokémia Vándorgyűlés, Budapest, augusztus 23-26, Összefoglaló: Biokémia, XXXIII. évf., 3. szám, 31. old.

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, április 27, Összefoglaló 50. old.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Kiss György Botondnak, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont főigazgatójának, hogy az intézetben lehetőséget biztosított a munkám elvégzéséhez.

Ezúton szeretnék elsősorban és mindenekelőtt köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Zsófiának, a folyamatos támogatásáért, szakmai segítségéért és türelméért, valamint, hogy biztosította a kísérletek hátterét.

Köszönöm Dr. Palkovics Lászlónak, Dr. Salánki Katalinnak és Dr. Salamon Pálnak a vírusos munkákhoz nyújtott iránymutatásaikat.

Köszönettel tartozom a Molekuláris Növényfiziológia és Biokémia Csoport minden tagjának szakmai tapasztalataik megosztasáért és tanácsaikért.