SZENT ISTVÁN EGYETEM

A burgonya SNF1 protein kináz komplexének vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A burgonya - a kukorica, búza és rizs után - a legfontosabb élelmiszernövényünk. Világszerte több országban termesztik és fogyasztják, mint bármely más kultúrnövényt. A gumó kialakulásának és fejlődésének kutatása ezért, mind biológiai, mind pedig gazdasági szempontból, jelentős feladat.

A gumó fejlődésének legjellegzetesebb eleme a nagy mennyiségű szénhidrát felhalmozódása. A szénhidrát-anyagcsere megismerésének eukarióta modellje az élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae*. *Az* élesztőben a szénhidrát-anyagcsere szabályozásának kulcsenzime az SNF1 (**S**ucrose **N**on-**F**ermenting 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).

Az élesztő SNF1 és a növényi SNF1-rokon kinázok 1. típusa (SnRK1) között jelentős szekvencia és 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 jellemezte 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 abban a HcPro játszik szerepet.

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

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Élő anyagok

A használt PVY vírus izolátumot Dr. Palkovics Lászlótól kaptuk. A vírust, burgonya növényen történt passzálást követően, *Nicotiana benthamiana* tesztnövényeken szaporítottuk fel a további vizsgálatok elvégzéséhez. A klónozási munkákhoz az *Esherichia coli* DH5α törzset használtuk. Az élesztő két-hibrid kísérleteket a *Saccharomyces cerevisiae* Y190, vagy Y187 törzzsel végeztük. Az i*n vitro* növényanyagokat hajtáscsúcsairól és szárszegmenseiről vegetatív módon szaporítottuk RM és MS (MURASHIGE ÉS SKOOG, 1962) táptalajon, 16/8 h fény/sötét fotoperiódus mellett, 24°C hőmérsékleten, papírdugóval lezárt üvegkémcsövekben. Az *in vivo* kísérletekhez használt növényeket cserepekben, steril, 80% tőzeget és 20% perlitet tartalmazó földkeverékben, üvegházban tartottuk. A téli időszakban 1-4 órás mesterséges pótmegvilágítást alkalmaztunk.

Molekuláris biológiai módszerek

A nukleinsavak izolálásában és manipulációjában (nukleinsav tisztítás, restrikcios endonukleázokkal történő hasítás, elektoforetikus elválasztás, plazmid vektorba klónozás, polimeráz láncreakció, c-DNS szintézis, transzformálás, hibridizációs technikák) a molekuláris biológiában általánosan használt, valamint a gyártó cégek által javasolt eljárásokat követtük. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatását két-hibrid rendszerben a Yeast Protocols Handbook CLONTECH Laboratories leírása szerint végeztük.

Fehérjék tisztítása, elválasztása és enzimaktivitás mérés

Fehérjék méret szerinti elválasztásához (FPLC) TANG és mtsai (2003) módszerét kisebb módosításokkal használtuk. A piruvát-kináz (PK) enzim aktivitását BURRELL és mtsai (1994) és TURNER és PLAXTON (2000) módszerének felhasználásával, azok kisebb módosításával határoztuk meg. A burgonya SnRK1 enzimeinek részleges tisztítását MAN és mtsai (1997) szerint végeztük, és foszforilációs aktivitásukat a SAMS peptid-szubsztráton egy általánosan használt foszforizotópos módszerrel mértük (MAN és mtsai, 1997; DAVIES és mtsai, 1989).

4. EREDMÉNYEK

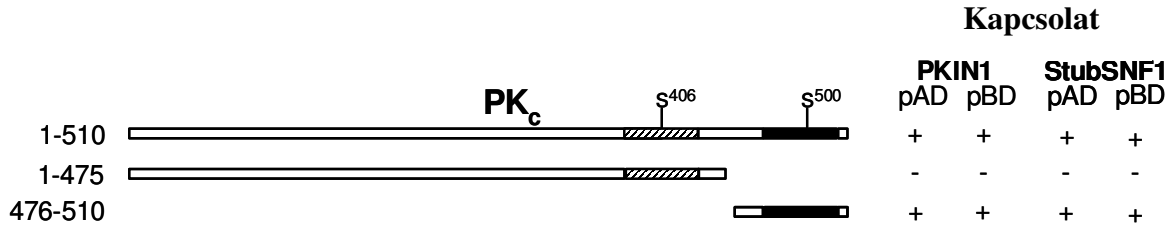
4.1. A burgonya SnRK1 fehérjéi és a PK_c kapcsolatának vizsgálata

Burgonya SnRK1 szubsztrátok keresése

Számítógépes szekvencia elemzéssel számos növényi enzimen találhatunk SnRK1 felismerő és foszforilációs konszenzus szekvenciát, X-[MLIF]-X-[RKY]-X-X-S-X-X-X-[LMVI]. Mi ezek közül a piruvát-kináz citoszolikus formájának, a PK_c-nek, és a burgonya SnRK1-einek kapcsolatát vizsgáltuk részletesen.

A PK_c-én két potenciális SnRK1 felismerő helyet találtunk. Ezek szekvenciája a következő volt: VLTRGGS^{406}TAKL és ALHRIGS^{500}ASVI. A PK_c és a burgonya két SnRK1-e közti kapcsolat vizsgálatát élesztő két-hibrid rendszerben végeztük. A PK_c-t a pAD-Gal4-be és a pBD-Gal4-be klónoztuk és a burgonya SnRK1-eivel megfelelő párosításban (pADStubSNF1-pBDPK_c; pADPKIN1-pBDPK_c; pBDStubSNF1-pADPK_c; pBDPKIN1-pADPK_c) 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_c-vel függetlenül attól, hogy melyik vektorba klónoztuk.

A felismerő hely lokalizálására deléciós származékokat készítettünk a PK_c-ből oly módon, hogy a származékok csak a S^{406} vagy a S^{500} körüli motívumot tartalmazták. A deléciós származékok megtervezésénél figyelembe vettük azt is, hogy a PK_c egyik lehetséges poszttranszlációs szabályozási útja egy kb. 4 kDa-os rész levágódása a C-terminális 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_c 89%-ban homológ a burgonya PK_c-vel. A burgonya PK_c-jén az egyik foszforilációs hely éppen ezen a potenciálisan levágódó részen van. Így a két tervezett deléciós származék a PK_{c1-475} és a $PK_{c476-510}$ lett. A fragmentumok előállítását PCR-rel végeztük, és a fragmentumokat pAD-Gal4, illetve pBD-Gal4 vektorokba építettük. Ezeket a konstrukciókat is élesztő két-hibrid rendszerben teszteltük. A PK_{c1-475} deléciós származék egyik SnRK1-gyel sem adott pozitív eredményt, míg a $PK_{c476-510}$ mindkettővel interakcióba lépett. Ebből arra következtettünk, hogy a S^{500} körüli felismerő hely szükséges és elégséges a kapcsolathoz mindkét SnRK1 esetében (1. ábra).



1. ábra A burgonya SnRK1-ei és a PK_c 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.

Az antiszensz SnRK1 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 összekötő 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.

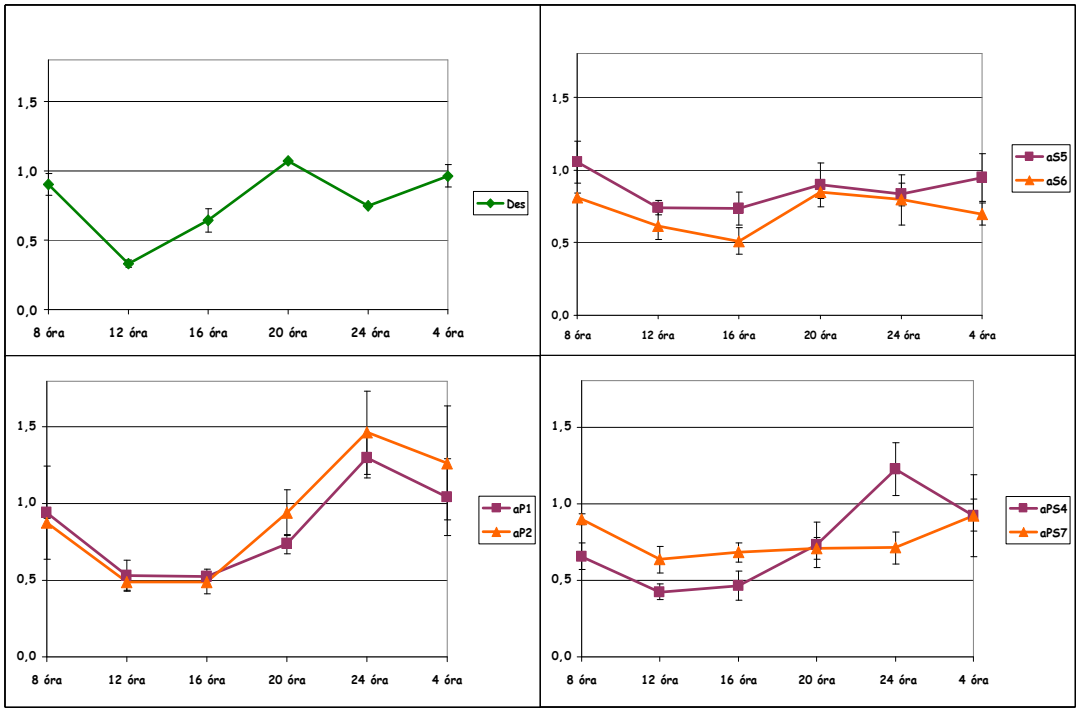
A SnRK1-eket *in vitro* antiszensz növényeink leveleiből részlegesen tisztítottuk, kontrollként vad típusú Désirée növényeket használtunk. Az SnRK1-ek aktivitására a SAMS-peptid foszforilációjának mértékéből következtettünk. Az antiszensz vonalak aktivitási értékei a kontrollhoz képest 25-75%-kal alacsonyabbak voltak és átlagosan 14% szórást mutattak. 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. Úgy gondoljuk, hogy ez az antiszensz gátlás tökéletlenségének, egyfajta mozaikosságnak a következménye (DE BLOCK, 1993; BIRCH, 1997). Az ilyen vonalakat általában kiszelektálják, és nem vizsgálják tovább. Így tettünk mi is, bár addigra már elvégeztük a vírusfertőzési kísérleteket is (lásd 4.2. fejezet „Vírusfertőzési kísérletek”). 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.

Az antiszensz gátlás a géncsendesítési mechanizmuson keresztül jön létre és együtt jár a gátolt génre specifikus kisRNS-ek megjelenésével (DI SERIO és mtsai, 2001). 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.

Az antiszensz SnRK1 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 (2. ábra). A SnRK1-ek gátlásának a PK aktivitásra kifejtett hatását a napi ciklus nyomon követésével végeztük. Azonos körülmények között növő antiszensz SnRK1 vonalaink és a vad típusú burgonya növények PK aktivitását négyóránként megmértük. Az így kapott eredményekből látszik, hogy az antiszensz SnRK1 növényekben mérhető PK ciklus egyértelműen és következetesen eltér a vad típusú növényekben mérhetőtől. 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 (2. ábra).



2. ábra A növények PK aktivitásának napi ciklusa

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

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.

Az antiszensz SnRK1 burgonya vonalak fehérjéinek elválasztása, FPLC-frakcióinak PK aktivitása

TANG és mtsai (2003) szójával végzett kísérleteik során arra jöttek rá, hogy a PK_c 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_c formát eredményez. A fejlődő szójamagban a szintetizálódó 55 kDa nagyságú PK_c mennyisége az idő előrehaladtával folyamatosan csökken, miközben az 51 kDa nagyságú származék feldúsul. FPLC kísérletekkel sikerült elkülöníteniük a két PK_c formát. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a burgonyában, a szójához hasonlóan, el lehet-e különíteni a két PK_c formát, és ha igen, akkor vajon a SnRK1-ek gátlása befolyásolja-e a burgonyalevélben detektálható PK_c formák arányát? Ehhez a

burgonya levelekből kinyert fehérjeelegyet FPLC oszlopon próbáltuk meg méret szerint szétválasztani és meghatározni az így nyert frakciók PK aktivitását. Az ötödiktől a tizedik frakcióig volt PK aktivitása a mintáknak. Az aktivitás, az aS6 vonal kivételével, az antiszensz SnRK1 vonalakban magasabb volt, mint a vad típusban, 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.

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

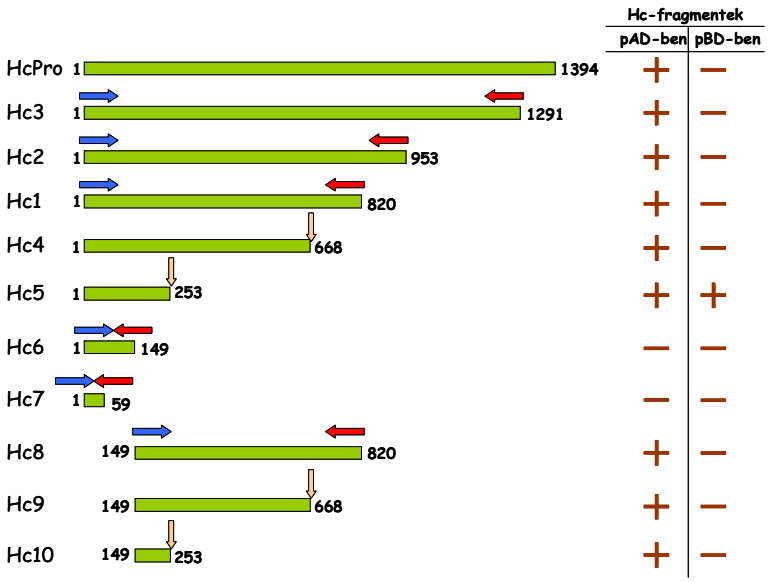
A geminivírusok AL2, illetve L2 fehérjéinek hasonló szerepe van, mint a potyvírusok HcPro fehérjéjének. Noha a funkcionális hasonlóság nem párosul gyakorlatilag semmiféle szekvencia homológiával, feltételeztük, hogy működik a geminivírusokéhoz hasonló rendszer a PVY esetében is, és a HcPro kapcsolatba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

Feltételezésünk igazolására élesztő két-hibrid kísérletet terveztünk. 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, pBDPKIN1-pADHcPro, 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 a pAD-Gal4, és a StubGAL83 a pBD-Gal4 vektorban van, akkor jól detektálható a kölcsönhatás a két fehérje között. Ellenkező felállásban, tehát, ha a HcPro a pBD-Gal4-ben és a StubGAL83 a pAD-Gal4 vektorban volt, negatív volt a teszt eredménye. Ennek az lehet a legvalószínűbb magyarázata, hogy a pBD-Gal4 plazmidban expresszálódó fúziós fehérje (a Gal4 DNS-kötő domén – HcPro) olyan konformációt vesz fel, ami lehetetlenné teszi a StubGAL83-mal a kapcsolat létrejöttét.

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.

A StubGAL83 és a PVY HcPro fehérje kapcsolatához szükséges HcPro régió lokalizálása

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 pADHcPro plazmidból *Sal*I-*Pst*I enzimekkel kivágtuk a *HcPro* gént és egy hasonlóan emésztett pBluescriptKS plazmidba klónoztuk. A kapott pBluescriptKS-HcPro plazmidból T3 és saját tervezésű primerek segítségével, vagy restrikciós endonukleázok segítségével 10 különböző hosszúságú *HcPro* fragmentumot izoláltunk. Az így nyert



3. 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

fargmentumokat az élesztő két-hibrid plazmidokba építettük, ügyelve arra, hogy a leolvasási keret ne tolódjon el. Vagyis az élesztőben keletkező fehérje valóban a vírusfehérje megfelelő fragmentumát reprezentálja. Az így előállított konstrukciók közül 8 lépett kapcsolatba a StubGAL83-mal (3. ábra). Hasonlóan a teljes hosszúságú HcPro-hoz, a Hc5 kivételével, minden HcPro származék csak a pAD vektorba klónozva adott pozitív eredményt. A Hc5 esetében azonban még akkor is pozitív eredményt kaptunk, amikor a Hc5 volt a pBD-GAL4 plazmidban. Ennek oka feltehetően az, hogy a GAL4 DNS-kötő domén-Hc5 fúziós fehérje konformációja olyan szerencsés, hogy lehetővé teszi a StubGAL83-mal való kapcsolat létrejöttét. 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.

Vírusfertőzési kísérletek

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 (aG) növények vírusfertőzésével a végére járhatunk ennek a kérdésnek. Feltételeztük, hogy az aG növények vírusfogékonysága csak 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 vad típusú és az aG növények közötti fogékonysági különbséget minél érzékenyebben ki tudjuk mutatni, azt a víruskoncentrációt kellett megtalálni, ami még éppen képes megfertőzni a vad típusú növényeket.

Üvegházban kiültetett kéthetes vad típusú Désirée burgonya növényeket öt csoportban fertőztünk, csoportonként 3-3 növényt 0.1, 1, 5, illetve 10 µg/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 µg/ml koncentrációjú vírus inokulum is még képes volt szisztemikusan fertőzni a három burgonyanövény közül kettőt, ezért úgy határoztunk, hogy a további kísérletekben 0.1 µg/ml töménységű inokulumot fogunk használni a növények fertőzéséhez.

A fertőzéseket levéltetvektől mentes általános növényházi körülmények között végeztük. Három aG 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 0.1 µg/ml koncentrációban. 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.

Az aG6 vonal minden kísérletben nagyobb (60-100%) fogékonyságot mutatott, mint a vad típus (40-70%). Ezzel szemben 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%).

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. Így tehát biztos eredményt csak a kísérletek folytatásával kaphatunk.

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:

1. A burgonya PK_c génjét és két deléciós származékát, amelyek külön-külön tartalmazzák a szekvencia elemzéssel azonosított, feltételezett SnRK1 felismerő helyeket, élesztő két-hibrid plazmidokba klónoztuk. Élesztő két-hibrid kísérletekkel igazoltuk, hogy mind a StubSNF1, mind a PKIN1 felismeri és kapcsolatba lép a PK_c 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 két-hibrid 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 PK_c 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.

A korábbi vizsgálatokból tudtuk, hogy az antiszensz StubSNF1, PKIN1 és StubGAL83 transzgénikus növényekben csökkent a gátlásnak megfelelő mRNS mennyisége és megjelentek a specifikus kisRNS-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 kisRNS 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 értékeket 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. 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 ki-be 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 hasonló 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 PK_c-val végzett kísérleteink bizonyítják, hogy a burgonya SnRK1-ek a PK_c-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_c is, mint SnRK1 szubsztrát. TANG és mtsai (2003) fejlődő szója embriókban végzett kísérletei alapján eddig csak feltételeztük, hogy a növényi SnRK1-ek részt vesznek a PK_c poszttranszlációs szabályozásában. TANG és mtsai (2003) bizonyították, hogy a PK_c

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_c-jével és ehhez a kapcsolathoz feltétlenül szükséges a S^{500} körüli régió jelenléte. Az S^{500}-t körülvevő 13 aminosavból álló, SAS-nak nevezett peptidet használva szubsztrátként Antal Ferenc nemrég kimutatta, hogy a StubSNF1 képes nemcsak a SAMS, de a PK_c eredetű SAS-peptid foszforilálására is.

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 - 4 órával később, az éjszaka közepén éri el. A PK aktivitás éjszakai megemelkedése biztosítja azt a piruvát mennyiséget, aminek oxidációja során jön létre annak a $NADPH_2$-nek és $FADH_2$-nek a jelentős része, amelyeknek az oxidációja során képződik a sejt nem-fotoszintetikus úton keletkező ATP mennyiségének túlnyomó része. Vagyis a megemelkedett PK aktivitás adja azt a piruvát 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_c 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.

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_c 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 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 StubGAL83-on 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. 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 csökkent 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.

Feltételezzük továbbá azt is, hogy azokban a vonalakban, amelyekben a StubGAL83 gátlás minden szervben egyöntetű volt (aG1, aG5), nem állt rendelkezésre a StubGAL83 a vírus HcPro-ja számára, így a növény anyagcseréjét nem tudta a saját érdekében megváltoztatni. A növény védekező mechanizmusai időben bekapcsoltak és sikeresen gátolták a vírus terjedését.

Lehetséges egy másik magyarázat is az aG vonalak eltérő vírusfogékonyságára. Ez a magyarázat az antiszensz gátlás eltérő molekuláris mechanizmusával függ össze. Tudjuk ugyanis, hogy az aG1-ben és aG5-ben az antiszensz gátlás hőmérséklet-függő, míg az aG6-ban hőmérséklet-független. Az aG1 és aG5 vonalban minden szervben megjelennek a kisRNS-ek, azonban ezek mennyisége alacsony (15°C) hőmérsékleten jelentősen kevesebb, míg az aG6 vonalban a csak levélben jelentkező gátlást a hőmérséklet nem befolyásolja (SÓS-HEGEDŰS és mtsai, 2005). Mivel a hőmérséklet pontos szabályozását a rendelkezésünkre álló üvegházi körülmények között nem tudjuk megoldani, ennek következtében a hőmérsékletingadozással együtt változik az StubGAL83 gátlásának mértéke is. Ez a jelenség is oka lehet a nagy szórásnak és az eltérő mechanizmusú gátlással rendelkező vonalaknál megfigyelt eltérő fogékonyságnak.

7. IRODALOMJEGYZÉK

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497. p.
endosperm. *Pl. Physiol.* 94, 1528-1534. 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.

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 acid-insensitive phenotype. Pl. Phyiol., 140, 263-278. p.

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.

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.

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 SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-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'-AMP. *Plant J.,* 19, 433-439. 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.

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

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Szakcikkek folyóiratokban

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

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 ZS. (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.