

## **Célfehérjék kódoló szekvenciáinak klónozása árpából és azonosításuk**

Szekvencia adatbázisok adatai alapján hidegkezelt "Nure" fagyűrő árpa fajtából klónoztunk egy feltételezett foszfatidilinozitol transzfer fehérjét (PITP) és egy feltételezett foszfatidilinozitol 4-kinázt (PI4K) kódoló szekvenciát. A munkát megkönnyítette, hogy a pályázat megírása óta eltelt időben felkerültek olyan árpából származó szekvenciák az adatbázisokba, melyek konzervatív doménjeik alapján vélhetőleg PITP, ill. PI4K fehérjéket kódolnak, így a felszaporításukat e szekvenciák alapján tervezett primerekkel végeztük TOPO-TA PCR klónozással. A PI4K klónozása során nehézséget okozott a hosszú kódoló szakasz (3,3 kilobázis) felszaporítása, ezért ezt két darabban klónoztuk meg és a végén ligáltuk össze a két szegmenst. Szekvenálással megállapítottuk a pontos kódoló szekvenciákat és azonosítottunk néhány aminosav eltérést az adatbázisban szereplő szekvenciához képest. Ez vélhetőleg az eltérő fajták genetikai különbségének tudható be, mivel az eltérések csendes, vagy konzervatív mutációknak bizonyultak. A cDNS klónozást és szekvenálást kétszer, egymástól függetlenül elvégeztük, hogy kiszűrjük a klónozás során esetlegesen megjelenő pontmutációkat. A vélt PITP hossza 284 aminosav, míg a PI4K 1101 aminosav hosszúságú. A kódoló szekvenciákat pET alapú módosított expressziós vektorba helyezve N-terminálisan GST-jelölt fúziós fehérjét termeltettünk *E. coli* expressziós baktériumtörzsben. A termelés során a fúziós fehérjék nagy része inklúziós testbe transzlokálódott, de egy kisebb hányad a szolubilis frakcióban maradt, így onnan affinitás tisztítással sikerült jól detektálható mennyiségű fehérjét pucolnunk. Ez a mennyiség elegendő volt a tervezett biokémiai vizsgálatok elvégzéséhez, ill. a beállított termelési és tisztítási módszernek köszönhetően bármikor tudtunk friss, tiszta fehérjét készíteni.

## **Lipid kötési vizsgálatok**

Fontosnak tartottuk, hogy *in vitro* adatokat is kapjunk a termeltetett fehérjék lipid kötési tulajdonságairól, ezért elvégeztük PIP-strip assay segítségével a lipid kötési vizsgálatokat végeztünk az általunk termeltetett foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) ill. foszfatidilinozitol transzfer fehérjével (PITP). A PI4K esetében nem találtunk ezzel a módszerrel specifikus kötést, míg a PITP esetében foszfatidil-kolin kötést sikerült kimutatni. A PITP esetében a kapott eredmény nem meglepő, hiszen ezekről a fehérjékről már ismert volt, hogy a foszfatidilinozitol mellett foszfatidil-kolin kötésére is képesek és a szubsztrátspecifitásukat valószínűleg a sejtbeli kofaktoraik, ill. a belső egyensúlyi állapotok szabhatják meg. Mivel a PIP-strip assay-nek vannak korlátai, ezért mindenképpen érdemes a későbbiekben liposome binding assay-t, vagy PIP bead assay-t is elvégezni, hiszen a strip-re kötött lipidek szerkezeti sajátosságai nem minden esetben teszik őket hozzáférhetővé kötési kísérletekben.

## **Kináz assay**

A baktériumból tisztított foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) aktivitását kináz assay-vel igazoltuk. Több ismert inhibitor is kipróbáltunk, de nem találtunk specifikus gátló hatást ezzel a módszerrel.

## **Szubcelluláris lokalizációs vizsgálatok**

Első lépésként megalapoztuk a konfokális mikroszkópos kísérletek kivitelezését Arabidopsis modellrendszerben mind a molekuláris, mind pedig sejtenyésztési munkákkal. Beállítottunk szuszpenziós sejt kultúra tenyészeteket, valamint létrehoztunk tranziens expresszióra alkalmas myc és GFP-tagelt konstrukciókat. Dr. Szabados László segítségével most már a laborunkban is tudunk rutinszerűen Arabidopsisból kallusz, ill. gyökér merisztéma eredetű szuszpenziós sejt kultúrákat indukálni, fenntartani, ill. belőlük mikroszkópozásra alkalmas protoplasztokat készíteni és tranziensen transzformálni. Ez a technológia lehetővé tette számunkra, hogy a mutáns vonalainkból is tudtunk konfokális mikroszkóppal szubcelluláris lokalizációs kísérleteket végezni. A konstrukciónk működését a protoplaszt rendszerben Western-blot segítségével igazoltuk. A beállított rendszer segítségével elvégeztük az árpa

foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) ill. foszfatidilinozitol transzfer fehérjék (PITP) szubcelluláris lokalizációs vizsgálatait konfokális mikroszkóppal. Azt találtuk, hogy a tranziensen expresszált fehérjék Arabidopsis protoplasztokban normál körülmények közt citoplazmás elhelyezkedésűek. A későbbiekben érdemes megvizsgálni stressz körülmények közt, ill. inhibitor kezelés mellett is a lokalizáció esetleges megváltozását, valamint a konstitutívan túltermelő növények szöveti preparátumaiban is elvégezhető a mikroszkópos vizsgálatok.

### **Funkcionális komplementációs kísérletek Arabidopsisban**

A vizsgált foszfatidilinozitol 4-kináz (PI4K) és foszfatidilinozitol transzfer fehérje (PITP) funkciójának igazolásához igénybe vettük az Arabidopsis modellnövény nyújtotta lehetőségeket. Sikert két PI4K deficiens T-DNS inszerciós mutáns vonalat beszerezni, melyeket funkcionális komplementációs kísérletekben használtunk. Elvégeztük e vonalak felszaporítását, homozigóta egyedeket válogattunk, valamint keresztezéssel létrehoztunk homozigóta dupla mutáns vonalakat is. A klónozott árpa PI4K gént bináris vektorba helyeztük, mellyel elvégeztük a mutáns Arabidopsis növények transzformálását. Emellett természetesen vad típusú Arabidopsis-ban készítettünk túltermelő transzformánsokat is a PI4K hatásának vizsgálatára. Mivel árpában nem állnak rendelkezésünkre mutáns vonalak, ezért szükségesnek tartottuk kibővíteni ezzel a vizsgálatainkat, mivel egy gén funkciójának igazolására a funkcionális komplementáció nagyon fontos eszköz. Csoportunkban eddig nem folytattunk munkát Arabidopsis-szal, így fontos új rendszerrel gazdagodott a kutatási/technikai repertoárunk.

A PI4K-ra dupla mutáns vonalakban sikerült jól detektálható fenotípust találni (törpe növekedés), ami nagyon fontos az árpa génekkal végzett komplementációs kísérletekben. Ezekben a transzformáns Arabidopsis növényekben érdekesnek tűnő jelenséget figyeltünk meg. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a PI4K inszerciós mutáns törpe növésű fenotípusát nemcsak az árpa PI4K kompenzálja, hanem bizonyos mértékig az árpa PITP is. Bár ez az eredmény nem tartozik szorosan a stressztűrési témakörhöz, de alapkutatási szempontból mindenképpen érdemes részleteiben vizsgálni a későbbiekben, mivel érdekes eredményeket szolgáltathat az inozitolfoszfat jelátviteli úttal kapcsolatban.

### **Árpa transzformáció**

A PITP és PI4K géneket pBRAC214 vektorba helyeztük, és elvégeztük az árpa transzformációt tavaszi Golden Promise fajtában. Osztályunkon erről a fajtáról már sok információval rendelkezünk, és többször hajtottak végre sikeres transzformációt kollégáink.

A transzformációt követően 9 független PITP, ill. 6 független PI4K vonalat azonosítottunk, melyek PCR pozitívak. A transzformáns T0 árpa növényekben elvégeztük a génexpressziós vizsgálatokat, és egy enyhe túltermelődést találtunk a genomi PCR-rel igazoltan transzformáns növényeknél. A T1 növényekben a PITP erős túltermelést mutatott a PITP transzformált vonalakban, és érdekes módon a PI4K transzformánsokban is emelkedett expressziót mutat. A PI4K csak enyhe túltermelést mutat a T1 növényekben.

### **Fenotípusos vizsgálatok árpa transzformánsokban**

A T1 transzformáns növényeket többféle fenotípusos tesztben vizsgáltuk. Kétféle fagytesztet végeztünk, az egyikben hosszabb edzést követően fagyasztottuk a növényeket. Itt két PITP, ill. egy PI4K túltermelő vonal mutatott szignifikánsan emelkedett fagyűrést. A másik típusú tesztben csak egy rövid edzést követő gyors, rövid fagyasztást végeztünk nagyon alacsony hőmérsékleten. Itt is találtunk szignifikánsan fagyűrőbb vonalakat, de ezek nem egyeztek a korábbi tesztben találtakal, ami arra utal, hogy más mechanizmus állhat a háttérben. Erre a választ a vonalak továbbtenyésztése, majd karakterizálása adhatja meg.

Vizsgáltuk a T1 növények csirázását só stresszben és itt is több vonalat azonosítottunk emelkedett stressztűréssel.

Ezek az eredmények igazolni látszanak a kiindulási elméletünket, miszerint a stressztűrésben szerepet játszó jelátviteli útvonalak kulcsszereplőinek emelkedett szintje fokozhatja a növények stressztűrését. A kapott eredményeket a T2 generáció nagyszámú, felszaporított egyedével tesztelve erősíthetjük meg, ill. finomíthatjuk. Ezek az eredmények egy nagyobb cikk alapjául szolgálhatnak.

### **A foszfatidilinozitol jelátviteli útvonal farmakológiai gátlása**

Mivel a transzformáns árpa növények elkészítése, felszaporítása, és kísérletekbe vonása időigényes, ezért az általunk vizsgált fehérjék által regulált útvonalakat farmakológiai úton is blokkoltuk árpa csíranövényekben, majd megvizsgáltuk, hogy a fagyűrészben kulcsszerepet játszó, különböző CBF transzkripciós faktorok hidegindukációjának szabályozásában szerepet játszanak-e. Itt érdekes új eredményeket kaptunk különböző CBF gének eltérő regulációjáról. Megállapítottuk, hogy a CBF géncsalád különböző tagjai a hidegindukációjuk során eltérő jelátviteli útvonalak által aktiválódnak, és az eltérő reguláció szoros összefüggést mutat az egyes CBF gének szekvencia alapján felállított rokonsági fokával. Ezeket az eredményeket a Journal of Plant Physiology-ban publikáltuk.

### **A hidegindukált gének regulációjának kalcium függése**

Mivel a kalcium kulcsszerepet tölt be a hidegindukált jelátvitelben, ezért az inhibitorokkal végzett expressziós kísérleteket kiterjesztettük, és megvizsgáltuk, hogy a hidegindukált gének közül melyek kalcium függőek, ill. a kalcium függő gének regulációját azonos kalcium-pool szabályozza-e. Ezekben a kísérletekben több géncsoportot azonosítottunk, attól függően, hogy az indukciójuk kalcium függő-e, ill. extracelluláris, vagy más forrásból származó kalcium felelős a bekapcsolásukért. Az eredmények publikálása folyamatban van.

### **Árpa de-differenciált sejtek hidegedződése**

A pályázat kezdetén úgy gondoltuk, hogy a későbbi vizsgálatokban szükség lesz árpa kallusz kultúrákra a vizsgálni kívánt fehérjék kutatásához, ezért megvizsgáltuk a kallusz sejtek viselkedését hidegedzés hatására. Ezekben a kísérletekben igazoltuk, hogy a de-differenciált sejtekben megvan a képesség a hidegedződésre. Az itt kapott eredményeket a Molecular Biotechnology folyóiratban közöltük.

### **Egyéb kutatások**

Az osztályon párhuzamosan folyó fény, ill. hideg regulációs génexpressziós vizsgálatokban felhasználtuk jelen pályázat egyes eredményeit is. Az így született eredmények a Journal of Experimental Botany-ban kerültek publikálásra.

## **Megjegyzések**

Nagyon fontosnak tartom megjegyezni, hogy a pályázat keretein belül kollégáimmal olyan módszereket állítottunk be a MTA ATK MGI Növényi Molekuláris Biológia Osztályán (árpa transzformálás, Arabidopsis munkák, konfokális mikroszkópia, fehérjemunkák), amik lehetővé teszik, hogy a későbbiekben rutinszerűen folytassanak korábban nem végzett kísérleteket.

A személyi állományban több változás történt. Korábban Marozsánné Tóth Zsuzsa terhessége miatt Boldizsár Ákos vette át a feladatait. Marozsánné Tóth Zsuzsa később máshol folytatta munkáját. A pályázat utolsó évében Vashegyi Ildikó és jómagam is elhagytuk az intézetet és az alapkutatást is, így a megkezdett kutatások befejezése és kiteljesítése a Növényi Molekuláris Biológia Osztály többi kutatójára vár.