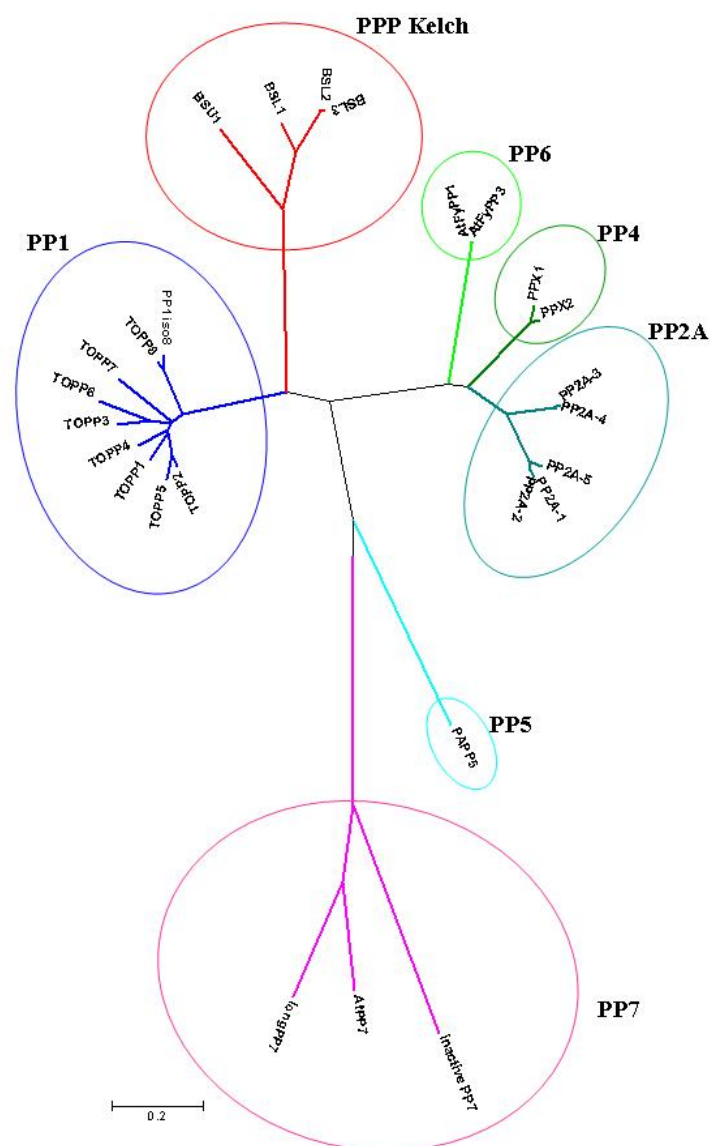


Szakmai beszámoló

Az Arabidopsis foszfoprotein foszfátáz enzimesalád

Az *Arabidopsis thaliana* adatbázisokban kutatva a foszfoprotein foszfátáz (PPP) enzimesalád 26 képviselőjének katalitikus alegységét azonosítottuk (Farkas I., Dombrádi V., Miskei M., Szabados L., Koncz C.: Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases (2007), Trends in Plant Science, nyomdában).






Az Arabidopsis PPP enzimek a PP1, PP2A, az új típusú PP4, PP5, PP6, PP7, továbbá PPP Kelch (ismétlődő kelch motívumot tartalmazó PPP) alcsaládokba sorolhatók. A PP2B alcsalád Arabidopsisban nem található meg. A PPP Kelch enzimek állatokban nem fordulnak elő.



1. ábra. Arabidopsis PPP foszfátázok katalitikus alegységeinek családfája. A PPP katalitikus alegységek aminosavszevenciájának filogenetikai és molekuláris evolúciós vizsgálatát a MEGA szoftver 3.1 verziójával végeztük. A vonal hossza oldallánconként 0,2 aminosavcsere-t jelent.

A PPP enzimek katalitikus alegysége regulátor fehérjékhez/alegységekhez kapcsolódik, amelyek növényi képviselői (a PP2A kivételével) alig ismertek. Azonosítottunk négy lehetséges PP1 regulátor fehérjét (1. táblázat).

1. táblázat. Feltételezett *A. thaliana* PP1 regulátor fehérjék

AGI szám	Név	1 100 200	Domén
At5g47790	NIPP-1 homológ		FHA
At3g20550	DDL (DAWDLE)		FHA
At5g19680	sds22 homológ		LRR RI
At5g52200	Inhibitor-2 homológ		IPP-2
At2g31305	Inhibitor-3 homológ		PPI_Ypi1

A doméneket a Smart keresőprogrammal azonosítottuk (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

FHA: “forkhead-associated” domén, LRR: leucine rich repeat, IPP-2: protein foszfatáz inhibitor-2 domén,

PPI_Ypi1: *Saccharomyces cerevisiae* protein foszfatáz 1 inhibitor Ypi1 domén.

Az *A. thaliana* PP2A-nak háromféle A-alegysége és számos B, B' vagy B'' – típusú változó alegysége azonosítható (2. táblázat).










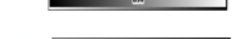









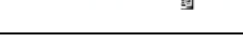

A növényi PPP enzimek funkciójáról viszonylag kevés adat található. A kutatás kezdetekor az új típusú és növény-specifikus foszfatázok voltak a legkevésbé ismertek, de a klasszikus PP1 és PP2A különböző izoenzimeinek funkcióját sem tárták fel. Célkitűzésünk így az Arabidopsis PPP enzimesalád kevésbé ismert képviselőinek funkcionális vizsgálata volt, a foszfatázok null mutánsainak segítségével.

PPP inszerciós mutáns vonalak azonosítása

A növényi gének funkcionális analiziséhez fontos genetikai eszközt jelentenek a különböző inszerciós mutánsok, amelyekben a génbe beépült T-DNS vagy transzpozon eliminálja a génfunkciót. Ezért a projekt első részében megpróbáltunk a vizsgálni kívánt Arabidopsis PPP génekre inszerciós mutánsokhoz jutni. A mutánsok egy részét nemzetközi kooperáció keretében Dr. Koncz Csaba inszerciós mutáns gyűjteményében azonosítottuk egy reverz genetikai kísérlet sorozat segítségével, a továbbiakat pedig a SALK és GABI-Kat gyűjteményekből rendeltük meg.

Az *A. thaliana* mutánsgyűjtemény szűrését a 96500 T-DNS inszerciós mutáns genomi DNS csoportjainak a T-DNS határszekvenciáira és a PPP génekre specifikus primerek segítségével, polimeráz láncreakcióval végeztük. Azonosítottuk a mutáns gént tartalmazó 100-as csoportot, majd preparatív PCR-t követő DNS szekvencia meghatározással ellenőriztük, hogy a T-DNS a vizsgálni kívánt génbe épült-e be. Ezután a magokból felnevelt növények DNS-ének PCR szűrése alapján azonosítottuk a mutáns vonalat.

2. táblázat. *A. thaliana* PP2A regulátor alegységek

AGI no.	Más nevek	Alegység	1 100 200	Domén
At1g13320	PR65 PDF2	A-alegység		HEAT
At1g25490	ATB β EER1 REGA RCN1	A-alegység		HEAT
At3g25800	PR65 PDF1	A-alegység		HEAT
At1g17720	ATB β	B-alegység		WD40
At1g51690	ATB α	B-alegység		WD40
At1g13460	ATB'θ	B'-alegység		B56
At3g09880	ATB'β	B'-alegység		B56
At3g21650	ATB'ζ	B'-alegység		B56
At3g26020	ATB'η	B'-alegység		B56
At3g26030	ATB'δ	B'-alegység		B56
At3g54930	ATB'ε	B'-alegység		B56
At4g15415	ATB'γ	B'-alegység		B56
At5g03470	ATB'α	B'-alegység		B56
At5g25510	ATB'κ	B'-alegység		B56
At1g03960	ATB''β	B''-alegység		EF-kéz
At1g54450	ATB''γ	B''alegység		EF-kéz
At5g18580	EMB40 FASS1 GDO (GORDO) TN2 (TONNEAU 2)	B''-alegység		EF-kéz
At5g28850	ATB''ε	B''-alegység		EF-kéz
At5g28900	ATB''δ	B''-alegység		EF-kéz
At5g44090	ATB''α	B''-alegység		EF-kéz
At5g53000	MNB8.6	TAP46		TAP42

A doméneket a Smart programmal azonosítottuk (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

A kék téglalapok rendezetlen elemeket, a pirosak kis komplexitású régiókat jelölnek. A BLAST jelentése: az adott domént csak a Blast programmal keresve találtuk meg.

A bioinformatikai munka, illetve a reverz genetikai szűrés eredményeként a 3. táblázatban feltüntetett foszfatáz mutánsokhoz jutottunk hozzá.

3. táblázat. A vizsgált *A. thaliana* foszfoprotein foszfatáz mutánsok

<i>PPP foszfatáz</i>	<i>Gén</i>	<i>Mutáns vonal száma</i>
PP6At1/AtFyPP1	At1g50370	17285 (Koncz)
BSL3	At2g27210	75426 (Koncz)
TOPP1	At2g29400	89453 (Koncz)
PP7/AtPP7	At5g63870	71859 (Koncz)
PP7/AtPP7	At5g63870	55915 (Koncz)
PP6At3/AtFyPP3	At3g19980	SALK_122405
BSU1	At1g03445	SALK_030721
BSL1	At4g03080	SALK_033442
BSL2	At1g08420	SALK_001731
PP2A-2 katalitikus alegység	At1g10430	GABI_072G03
PP2A B'' α regulátor alegység	At5g44090	GABI_121E09, GABI_205D02

Fenotípus vizsgálatok

A fenotípus vizsgálatához a T2 nemzedékből nyert DNS PCR szűrésével a PPP gén mutációjára homozigóta növényeket kerestünk, és Southern blot segítségével ellenőriztük a T-DNS inszerciók számát.

A homozigóta mutáns növények és a vad típusú (Columbia-0 ökotípusú) növények felépítésében, fejlődésében nem volt számottevő különbség a szokásos nevelési körülmények között, valamint alacsony hőmérsékleten (10°C). A mutáns PP6At1, BSL3 és PP7 gént hordozó növények fenotípusát a következő körülmények között kerestük:

Csírázási tesztek: 0,5-1,5 μ M abszcizinsav, ABA (csírázást gátló hormon); 10 μ M gibberellinsav, GA3 (csírázást serkentő hatású hormon); 0,2 μ M 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (szintetikus auxin); 1 μ M N6-benzilamino-purin (citokinin); 0,1 mM szalicilsav (hormon); 4% és 8% glükóz (növekedésszabályozó, ozmotikum), 8% szacharóz (sejtciklus-és differenciálódás szabályozása, keményítő felhalmozás); nátrium-klorid (ozmotikum), 150 mM és 200 mM koncentrációban; 300 mM és 400 mM mannitol (ozmotikum); 50 μ M kadmium-klorid (oxidatív stresszt előidéző toxikus nehézfém); 0,5 μ M paraquat (szabadgyökök termelését indukáló gyomirtószer). 50mg/l etephon (etilén) hatása a csíranövény fejlődésére.

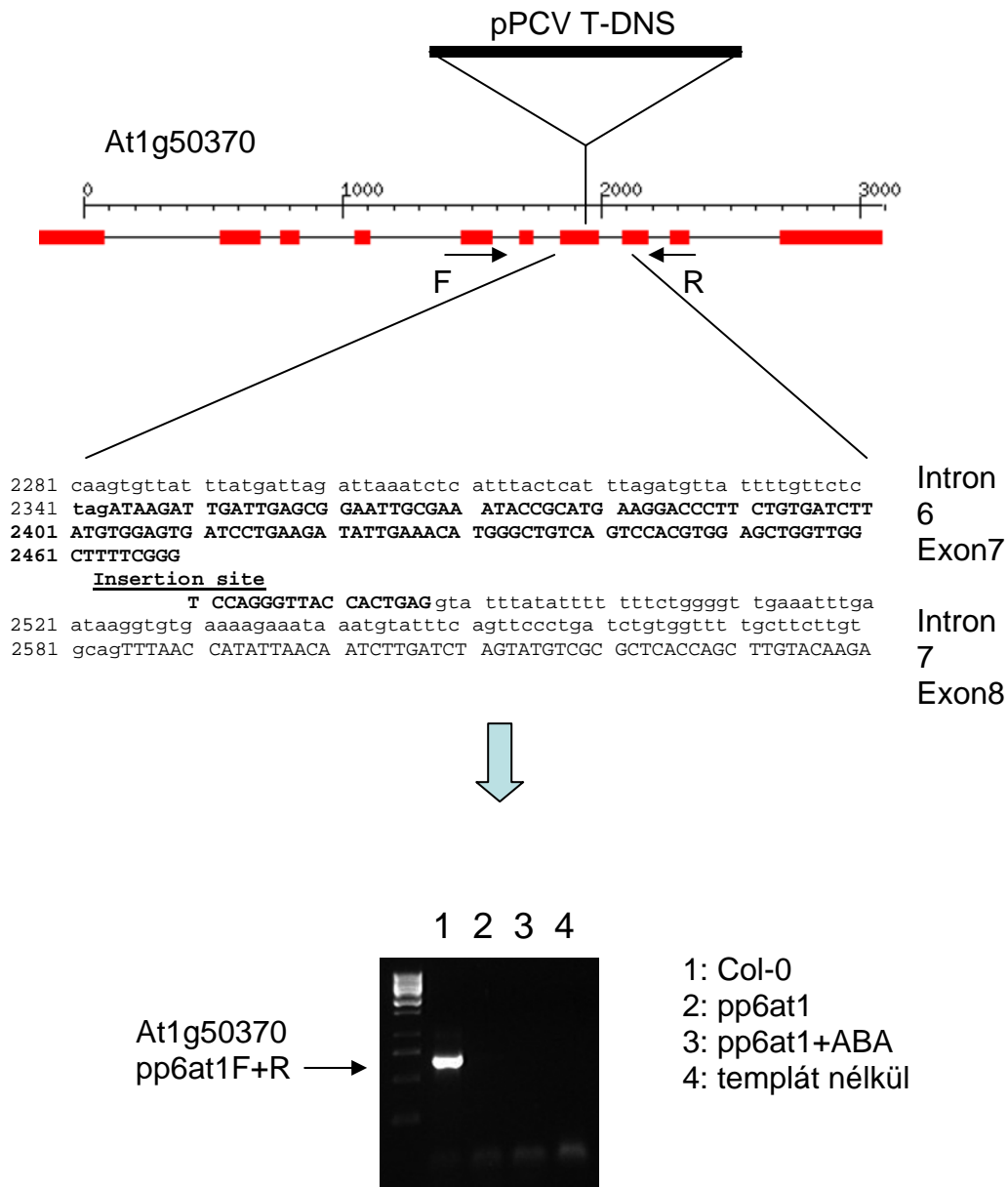
Gyökérhossz-mérések: 10 és 50 μ M GA3, 1 μ M ABA, 150 és 200 mM NaCl, 400 mM mannitol hatása

A növények friss tömegének mérése. 1 μ M ABA, 150 és 200 mM NaCl, 400 mM mannitol hatása

Kék és távoli vörös, valamint vörös fényben nevelt csíranövények hipokotilhosszának mérése (0-15 μ E, illetve 0-116 μ E intenzitástartományban (Dr. Nagy Ferenc és mtsai segítségével) Virágzási idő meghatározása hosszú nappalon (Dr. Nagy Ferenc laboratóriumában)

PP6 funkcionális vizsgálata

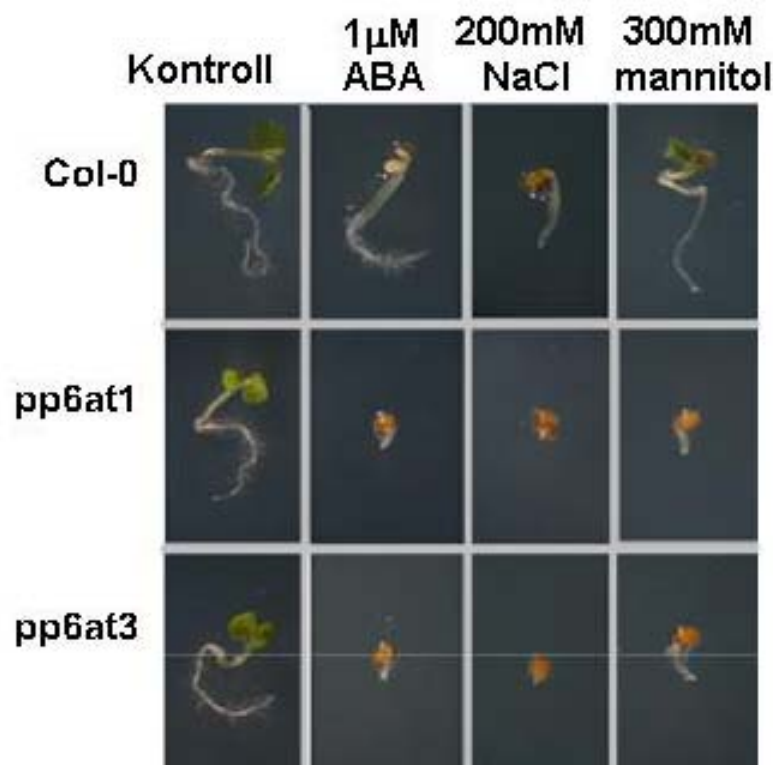
A *pp6at1* mutáns. A 17285-ös vonalban a PP6At1 génjének hetedik exonjába épült be T-DNS (2.ábra). Az inszerció RT-PCR analízisünk szerint meggátolja a gén átíródását. A PP6At1 enzim hiánya nem eredményez szignifikáns csökkenést a mutáns növény kivonatának foszforiláz *a* szubsztráttal mért foszfatáz aktivitásában.



2. ábra. A *pp6at1* inszerció mutáns analízise. A Koncz_17285 mutáns vonalban a T-DNS inszerció az 7. exonban van. A gén szerkezetét mutató ábrán bejelöltük az inszerció helyét és a PCR reakcióban alkalmazott primerek helyzetét. A kinagyított szekvencia pontosan mutatja az inszerció helyét. A T2 generációs homozigóta vonalban génspecifikus primerekkel (F: *pp6at1*-F, R: *pp6at1*-R), RT-PCR segítségével teszteltük az At1g50370 gén transzkripcióját. Látható, hogy a vad típusú növényből származó cDNS templáton a génspecifikus primerekkel amplifikálható a géne jellemző fragment, míg a homozigóta mutánsban ez hiányzik. ABA kezelés nem befolyásolta az eredményt. A *pp6at1* mutáns tehát teljes funkcióvesztés (*knock out*) mutánsnak tekinthető. Hasonló módon analizáltuk a többi inszerció mutáns.

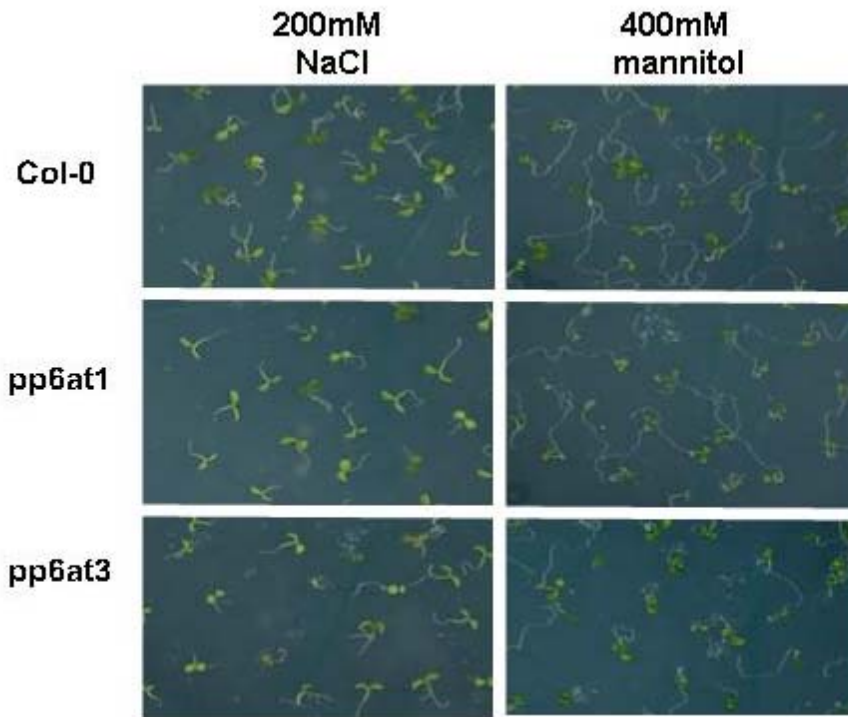
A 17285-ös *pp6at1* vonal csírázási tesztben abszcizinsavra (ABA), továbbá NaCl-ra és mannitolra fokozottan érzékenynek bizonyult (3. ábra). A genomi DNS Southern blot analízise szerint a 17285-ös vonalban más génbe nem épült be T-DNS, így a fenotípus a PP6At1 hiányával függ össze. A korábban felsorolt egyéb vizsgálatokban reprodukálható fenotípust nem észleltünk.

ABA, NaCl-és mannitol-érzékenységet mutat a *SALK_122405* vonal is (*pp6at3*, mutáció a PP6At3 génben). A PP6At1 és PP6At3 fehérje csupán két aminosavban tér el egymástól, ezért funkciójuk nagymértékben hasonló lehet. A *SALK_122405* vonal vizsgálataink szerint azonban nem null mutáns, és emellett második T-DNS inszerciót is tartalmaz a genomban.



3. ábra. Csírázási teszt. A Col-0 vad típusú, illetve a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsok csírázása 200mM NaCl, 300mM mannitol, illetve 1µM ABA jelenlétében. A *pp6at1* és *pp6at3* mutánsok fokozott érzékenységet mutatnak só-stressz, ozmotikus stressz és ABA kezelésre. Míg a kontroll táptalajon a mutánsok és a vad típusú Arabidopsis növények csírázása hasonló, a bemutatott kezelések esetén a mutánsok csírázása gátolt, illetve jóval lassabb a vad típusú növényekénél.

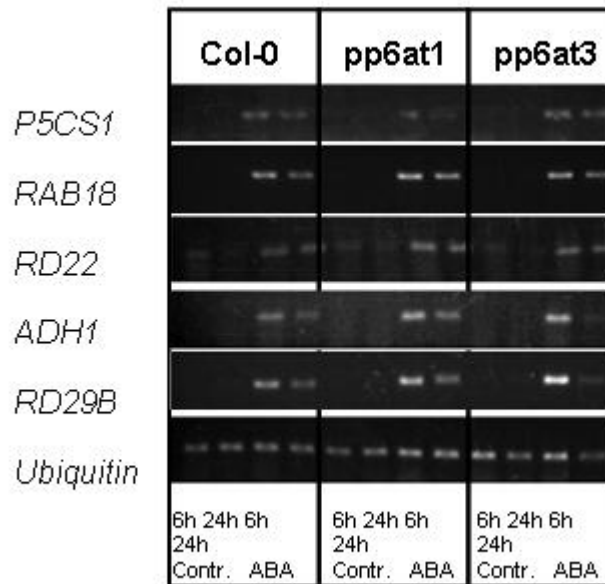
Összehasonlítottuk a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsok növekedését só- és ozmotikus stressz közben. (4. ábra). A 200mM NaCl tartalmú táptalajon a Col-0 vad típusú növény csökkent életképessége és lassú növekedése figyelhető meg. Ezen a táptalajon a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsok növekedése leáll, a gyökér elhal, és később maga a növény is elpusztul. Nagy koncentrációjú mannitol (ozmotikus stressz) csökkenti a vad típusú növény gyökerének növekedését. A mutánsok gyökér növekedése jóval kisebb a mannitol tartalmú táptalajon, mint a vad típusú növényeké.



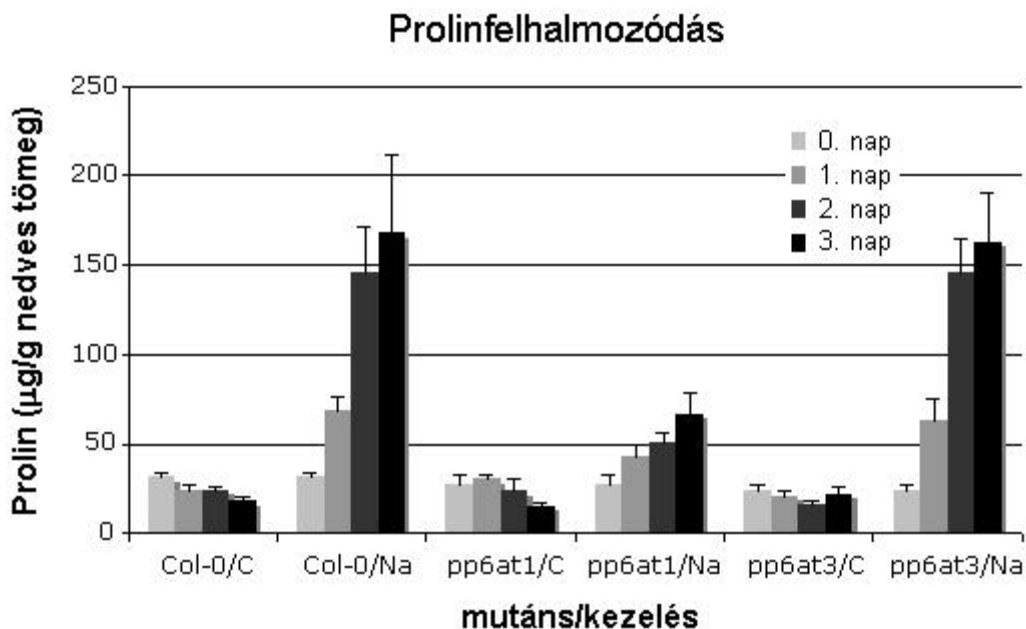
4. ábra. A *pp6at1* és *pp6at3* mutánsok növekedésének összehasonlítása só- és ozmotikus stressz közben.

Az ABA által szabályozott folyamatok közül a sztómazáró hatást vizsgálva nem találtunk különbséget 10^{-7} - 10^{-4} M ABA hatásában vad típusú növény és a *pp6at1* mutáns között.

Az ABA hormon számos stressz-indukált gén expresszióját szabályozza. Mivel a *pp6at1* mutáns fokozott ABA érzékenységet mutatott, megvizsgáltuk néhány stresszel indukálható gén expresszióját a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsokban. A mutáns és vad típusú növényeket 0, 6 vagy 24 órán át kezeltük 50 μ M ABA hormonnal, és az izolált RNS mintákban RT-PCR segítségével teszteltük a *P5CS1*, *P5CS2*, *RD22*, *RD29B*, *RAB18* és *ADH1* gének expresszióját (5. ábra). Szignifikánsan kisebb volt a *P5CS1* (Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz) gén expressziója ABA kezelés után a *pp6at1* mutánsban. Mivel a *P5CS1* a glutamátból történő prolinszintézis sebességmeghatározó lépését katalizálja, meghatároztuk a prolin koncentrációját NaCl kezeléssel kiváltott 1, 2 és 3 napos stressz hatására és anélkül (6. ábra).

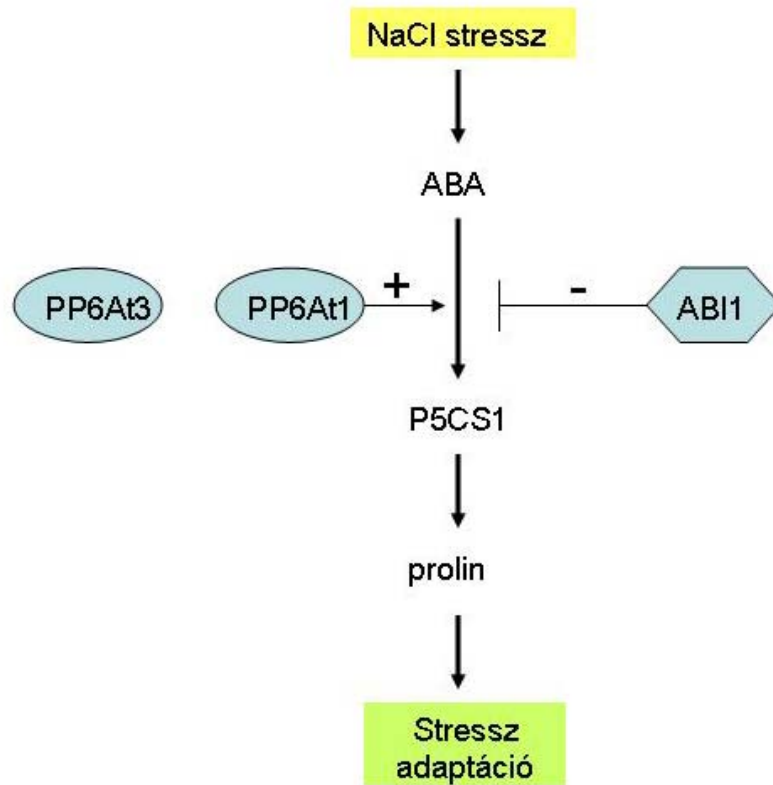


5. ábra. Néhány stresszindukált gén expressziójának változása a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsokban. Mindegyik gén transzkripciója emelkedik 6 illetve 24 óra ABA kezelés után. A prolin bioszintézist szabályozó *P5CS1* gén expressziója alacsonyabb szintű a *pp6at1* mutánsban, ami arra utal, hogy a gén ABA indukciójában szerepet játszik a vad típusú PP6At1 gén. A *RAB18*, *RD22*, *ADH1* és *RD29B* gének transzkripciója nem változik a mutánsokban. Referenciagén: ubiquitin 10



6. ábra. Prolin felhalmozódás változása a *pp6at1* és *pp6at3* mutánsokban. Kéthetes csíranövényeket kezeltünk 200mM NaCl-dal kiegészített tápoldattal 0-1-2-3 napig, és a prolin felhalmozódást 5 ismétlésben mértük. Látható, hogy a kezeletlen, kontroll mintákban (C.) a prolintartalom hasonló, míg a sókezelt mintákban (Na) fokozatosan emelkedik. A Col-0 vad típusú növényekben valamint a *pp6at3* mutánsban a prolin felhalmozódás hasonló, míg a *pp6at1* mutánsban alacsonyabb szintű. A csökkent prolin felhalmozódásért valószínűleg az alacsony expressziós indukciót mutató *P5CS1* aktiválás felelős.

A NaCl-dal előidézett prolinfelhalmozódás jelentősen alacsonyabb volt a *pp6at1* mutánsban, míg nem tért el szignifikánsan a *pp6at3* mutáns esetében. Mivel a prolin az ozmotikus stresszel szemben védő hatású, az alacsonyabb prolinszint összhangban van a *pp6at1* mutáns csírázásának fokozott stresszérzékenységgel. Eredményeink szerint tehát a *thaliana* PP6 foszfatáz(ok)nak valószínűleg szerepe van az ABA-függő ozmotikus stresszválaszban (7. ábra).



7.ábra. Foszfatázok szerepe a prolin felhalmozódásban illetve a stressz adaptációban. Egyszerűsített modell. Az általunk vizsgált PP6At1 illetve PP6At3 gének közül a PP6At1 pozitív módon befolyásolja az ABA jelátvitelt, ami a P5CS1 gén transzkripcióját is szabályozza. A *pp6at1* mutánsban ugyanis csökkent az ABA által indukált P5CS1 transzkripció, illetve a sóstressz során mért prolin felhalmozódás. A *pp6at3* mutánsban nem tapasztaltunk hasonló változást, ami a két hasonló gén némileg eltérő szerepére utal. Az ABI1 foszfatáz negatív módon befolyásolja a P5CS1 expressziót is szabályozó ABA jelátvitelt.

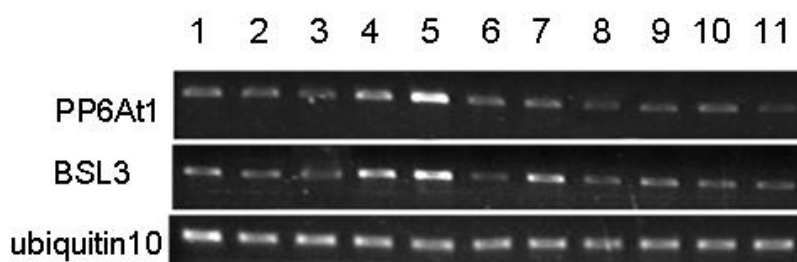
Kutatásunk ideje alatt közölték, hogy a PP6At1 és PP6At3 zabban található homológja fitokróm a-val és b-vel kölcsönható foszfatáz (FyPP) és az Arabidopsis enzimek funkciója is hasonló, továbbá a két gén együttes vagy csak a PP6At3 csendesítése a virágzási időt csökkenti. A PP6At1 szerepét külön nem vizsgálták (Kim *et al.*, Plant Cell 14, 3043-3056, 2002). Ezért összehasonlítottuk a *pp6at1* mutánsok virágzási idejét a vad típusú növényekével. Eredményeink szerint a PP6At1 kiütése nem változtatja meg szignifikánsan a virágzási időt a vad típusú növényhez képest.

A *pp6at1* mutáns komplementációja, valamint vad típusú növényben a PP6At1 overexpressziója céljából az ABRC-ből megkapott cDNS-t pPCVB1 növényi expressziós

vektorba klónoztunk, majd szekvenciájának ellenőrzése után *E. coli*ből *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/ pMP90RK-ba építettük be a HB101/pRK2013 *E. coli* segédtörzs felhasználásával („tri parental mating”). A mutánsok komplementálása és a PP6At1 gén overexpresszióját célzó transzformációs kísérletek folyamatban vannak.

Vadtípusú növény szerveiből és csíranövényekből izolált RNS-ek RT-PCR analízisével megállapítottuk, hogy a PP6At1 a vizsgált valamennyi szervben (gyökér, rozettalevél, szárlevél, szár, virágbimbó, virág, zöld termés és érett termés), továbbá a 3-és 8-napos csíranövényekben is átíródik. Legmagasabb szintű expressziót a szárban és a virágbimbóban észleltünk (8. ábra).

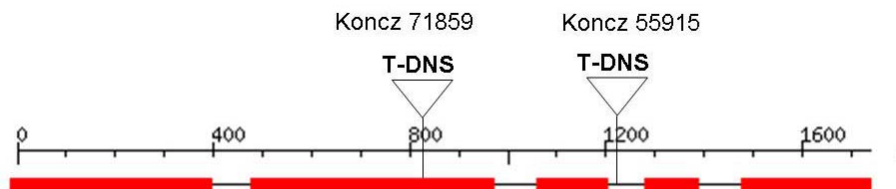
Az Arabidopsis PP6 gének funkcionális analízisét leíró közleményünk előkészületben van.



8. ábra. A PP6At1 és BSL3 protein foszfatáz gének expressziójának analízise. Génspecifikus primerekkel RT-PCR reakcióval tanulmányoztuk a különböző szervekből izolált RNS mintákból kapott cDNS templátokon az adott génekre jellemző transzkript mennyiségét. Az RNS minták eredete: 1: gyökér, 2: rozettalevél, 3: szárlevél, 4: szár, 5: virágbimbó, 6: virág, 7: zöld termés, 8: érett termés, 9: 3 napos csíranövény (*in vitro*), 10: 8 napos csíranövény (*in vitro*), 11: fonyadó levél. A PP6At1 gén a szárban és virág bimbóban, míg a BSL3 gén szárban, virág bimbóban, éretlen termésben, és csíranövényekben mutatott viszonylag magas expressziót. Referenciagén: ubiquitin 10.

PP7 funkcionális vizsgálata

A 71859-es vonal esetében a T-DNS az AtPP7 (At5g63870) gén második exonjába, míg az 55915-ös vonalnál a 3. és 4. exon közötti intronba épült be (9. ábra).



9. ábra. T-DNS beépülés az AtPP7 génbe: Koncz_71859 és Koncz_55915 vonalak

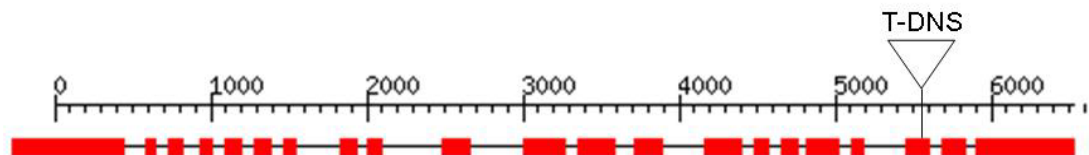
Csírázási tesztben egyik vonal sem mutatott fenotípust. A fény hatásának vizsgálatát a 71859-es vonallal végeztük. A várakozásnak megfelelően a mutánsok sötétben mért értékre normalizált hipokotilhossza kék fényben hosszabb volt, mint a vadtypusé, bár ez a fenotípus gyengébb volt, mint a gén csendesítése révén kapott növényeké (Moller, S.G. és mtsai (2003)

Plant Cell 15, 1111-1119). Az eltérés egyik lehetséges oka, hogy a csendesítés az AtPP7-tel homológ At1g48120 gént is érintette. Eredményeink megerősítik, hogy a PP7-nek szerepe lehet a kék fény jelátvitelében.

RT-PCR analízisünk szerint az AtPP7 gén a vad típusú növény valamennyi vizsgált szervében átíródik.

BSL3 funkciójának vizsgálata

A 75426-os mutáns vonalban az At2g27210 (BSL3) gén 19. exonjába épült be T-DNS (10. ábra). Második T-DNS-t a genom Southern blot alapján nem tartalmazott. Az RNS RT-



10. ábra. A T-DNS inzert helyzete az At2g27210 génben a *bsl3* vonal esetén

PCR analízisével a génről származó transzkriptet nem tudtunk kimutatni, a mutáns teljes funkcióvesztéses allélnak tekinthető. A vad típusú és a mutáns növény kivonatának foszforiláz foszfatáz aktivitása között szignifikáns különbséget nem találtunk.

A mutáns csírázásában, továbbá vörös, távoli vörös és kék fényben kialakuló hipokotilhosszában számottevő, reprodukálható eltérést nem tapasztaltunk a vad típusúhoz képest.

A BSU1 *kelch*-motívomot tartalmazó foszfatáz a brassinoszteroid szignálátviteli út pozitív regulátora, amely a BES1 transzkripciós faktor foszforilációs állapotát szabályozza és a sejtmagban lokalizálódik [Mora-Garcia és mtsai (2004) Genes Dev. 18, 448-460]. Az ugyancsak PPP *Kelch* típusú BSL3 hasonló szerepét feltételezve vizsgáltuk a brassinazol (brassinoszteroid bioszintézis inhibitor) hatását a sötétben nevelt *bsl3* és vad típusú, sötétben nevelt csíranövény hipokotilhosszára. Az inhibitor mindkét esetben hasonló méretcsökkenést okozott. Feltételezhető, hogy a nagymértékben azonos szekvenciájú PPP *Kelch* enzimek funkciója átfedő, a *bsl3* fenotípusának hiánya ennek tulajdonítható. A BSL2 és BSL3 gén együttes csendesítése törpenövést eredményez (Mora-Garcia és mtsai, 2004).

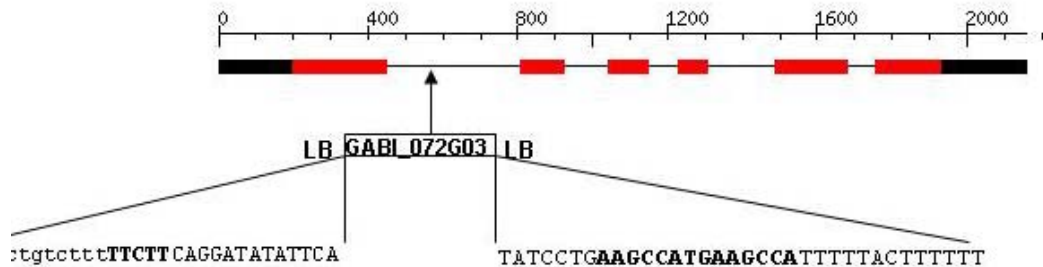
A BSL3 mRNA a vad típusú növény valamennyi vizsgált *A. thaliana* szervben megjelenik, legnagyobb mennyiségben a szárban, virágbimbóban és az éretlen termésben (8. ábra).

A BSL3 overexpressziójához és sejtmagi lokalizációjának megállapításához cDNS-ét egy *Arabidopsis* sejtszuspenzióból készített pACT2 cDNS-könyvtárból (Dr. Koncz Csabától) polimeráz láncreakcióval klónoztuk, és pGEM-T Easy vektorba illesztettük. Ezután végein PCR módszerrel *XbaI* és *SmaI* hasítási helyeket kialakítva Bluescript KS(+) vektorba ligáltuk, majd áttettük sárga fluoreszcens fúziós fehérje termelését biztosító bináris vektorba [35S(2x)YFP pPCVB]. Szekvenciájának ellenőrzésekor két, aminosavcsere eredményező pontmutációt találtunk az N-terminálison, ami a vektorkonstrukció javítását teszi szükségessé.

Kettős növény-specifikus foszfatáz mutánsok előállítására céljából a *bsl3* mutáns sikeresen keresztezni a *bsu1*, valamint a *bsl1* vonallal. Ezek a vonalak szembetűnő fenotípust nem mutatnak, ugyanakkor nem-foszfatáz génben is tartalmaznak T-DNS inszerciót. A foszfatáz génekre kettős mutáns homozigóta növények azonosítására a projekt ideje alatt idő hiányában már nem került sor.

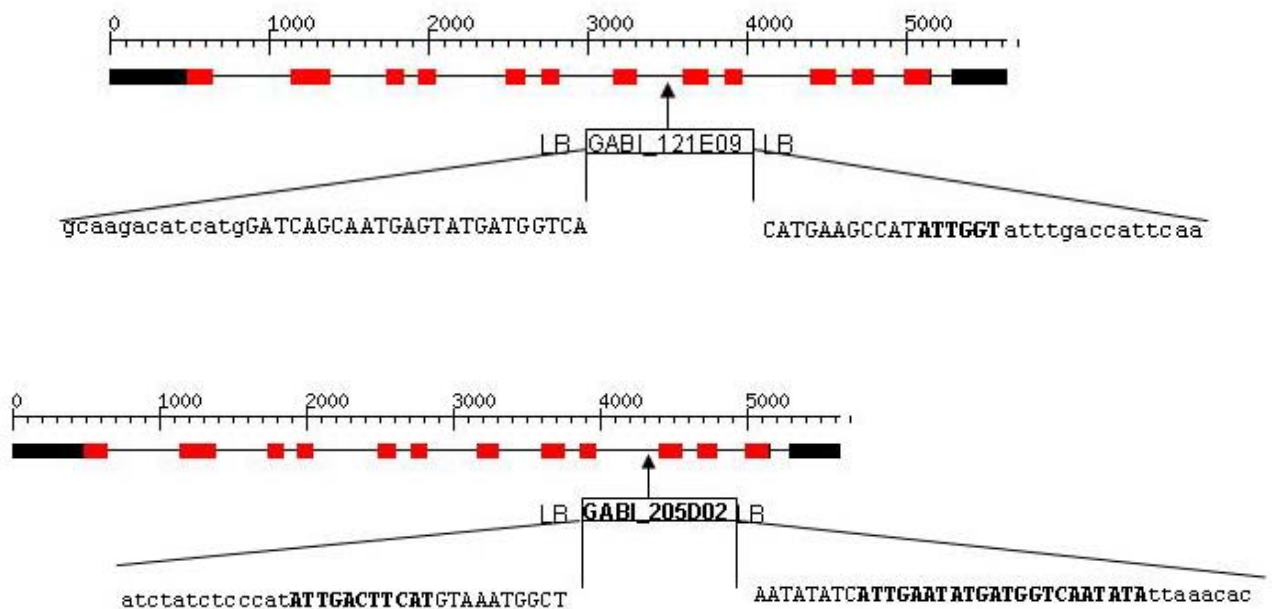
PP2A funkcionális vizsgálata

Dr. Koncz Csabával együttműködve vizsgáltuk a következő mutáns vonalakat:
GABI_072G03 : a PP2A-2 katalitikus alegység génjének első és második exonja közötti intronban tartalmaz T-DNS inszerciót (11. ábra), fél-hímsteril és fél-törpe fenotípust mutatott, ami nem szegregált együtt az inszercióval.



11. ábra. *GABI_072G03* mutáns: T-DNS inszerció az *At1g10430* génbe. A kisbetűk növényi szekvenciákat, a nagybetűk T-DNS szekvenciákat, a vastag betűk kitöltő (filler) szekvenciákat jelölnek. A két ellentélesen orientált, tandem T-DNS beépülése a célgénben 27 bp deléciót okozott.

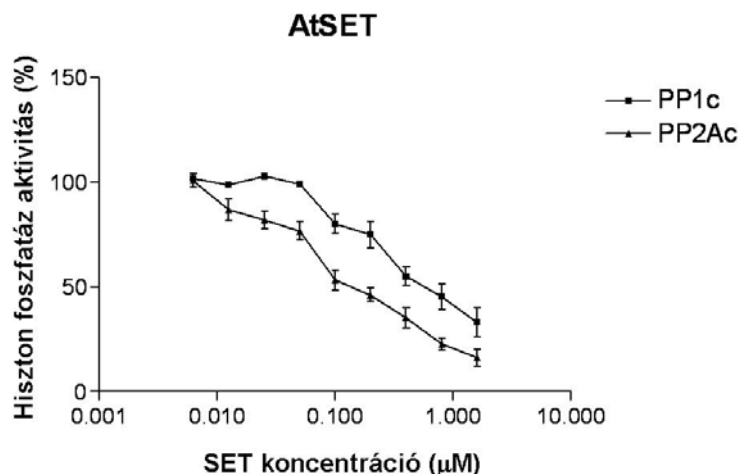
GABI_121E09 és *GABI_205D02*: az inszerció a PP2A B α regulátor alegység génjének 7. és 8., illetve 9. és 10. exonja között levő intronban van (12. ábra). Mindkét vonal esetén tapasztalható embrió letalitás, ami azonban a szegregációs analízis szerint független a PP2A B α gén mutációjától.



12. ábra. Inszerció az *At5g44090* génbe: *GABI_121 E09* és *GABI_205D02*

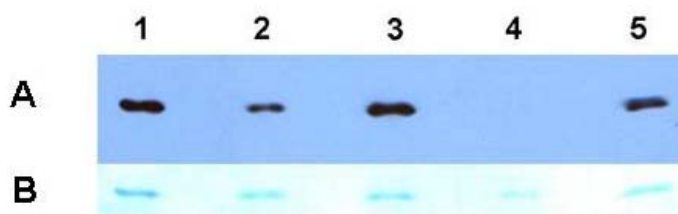
A PP2A-2 katalitikus alegységet, illetve a B α regulátor alegységet feltehetőleg helyettesíthetik a hasonló szekvenciájú és expressziós profilú izoformák, ezért a mutánsoknak nincs szembevető fenotípusa.

A PP2A számos fehérjével asszociálódhat, amelyek szabályozó funkciót töltenek be. Ezek közé tartozik a SET, a PP2A inhibitora. Dr. Fehér Attilával folytatott együttműködésben korábbi vizsgálataink során azonosítottuk és baktériumban expresszáltuk a SET lucerna homológját. Sikerült azonosítani a SET homológot Arabidopsisban is (AtSET). Az AtSET-et ugyancsak baktériumban termeltetett fúziós fehérjeként állítottuk elő. Megvizsgáltuk hatását a nyúl PP1 és PP2A katalitikus alegységére (PP1c és PP2Ac), foszforilált hiszton 2B (13. ábra) és foszforiláz a szubsztráttal. Az AtSET a PP2Ac-t jobban gátolta, mint a PP1c-t, és foszfohiszton szubsztrát esetében nagyságrenddel kisebb koncentrációban hatásos volt.



13. ábra. AtSET hatása PP1c és PP2Ac hiszton foszfatáz aktivitására

Anti-foszfo-Ser-10-hiszton H3 antitesttel, Western blot segítségével kimutattuk, hogy hasonlóan a *Drosophila* homológhoz, az AtSET gátolja a hiszton H3 Ser-10 oldallánc defoszforilációját PP2Ac-vel (14. ábra), ami összhangban van feltételezett szerepével a transzkripció szabályozásában. A SET-tel kapcsolatos eredményeket bemutató, Dr. Fehér Attilával közös közleményünk előkészületben van.



14. ábra. AtSET hatása a hisztonH3 Ser-10 oldalláncának foszforilációs állapotára a PP1c-vel és PP2Ac-vel való defoszforilációban. 5 µg hiszton H3-at 40 µl közegben 17 mU PP1c vagy 2 mU of PP2Ac, 45 mM imidazol -HCl (pH 7.2), 5 mM MnCl₂, 150 mM NaCl, 8 mM 2-mercaptoethanol és 3 µM At Set jelenlétében vagy távollétében 30°C-on inkubáltunk. 60 perc múlva, 10 µl of 5 X SDS mintapuffer hozzáadása után az oldatokat 100 °C-on 5 percig forraltuk. 2 µg hiszton H3-at tartalmazó mintákat SDS-PAGE-val választottunk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoltunk. A: Az immundetektálást nyúl anti-foszfo-Ser-10-hiszton H3 monoklonális antitesttel és kecske anti-nyúl IgG peroxidáz konjugátummal végeztük és ECL módszerrel detektáltuk B: a mintákban levő hiszton H3 mennyisége Coomassie Brilliant Blue-val való festés után.

1: hiszton H3; 2: hisztonH3+ PP1c; 3: hiszton H3+ PP1c + AtSet; 4: hiszton H3 + PP2Ac; 5: hiszton H3 + PP2Ac + AtSET.

Tudományos közlemények

Az Arabidopsis PPP foszfatázokról szóló közleményünk 2007. áprilisban jelenik meg (Farkas I., Dombrádi V., Miskei M., Szabados L., Koncz C.: Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases (2007), Trends in Plant Science, nyomdában). Két további közleményt jelenleg készítünk:

Biró J, Ötvös K, Farkas I, Frankard V, Szűcs A, Domoki M, Dombrádi V and Fehér A (2007) The plant NAP/SET protein affects histone phosphorylation and transcriptional regulation. Plant Physiology (előkészületben) és

Ábrahám E., Cseh É., Szabados L., Gergely P., Dombrádi V., Koncz C., Farkas I. PP6 protein phosphatase genes control abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana* (előkészületben)

Eredményeinkről hazai és nemzetközi konferenciákon öt posztert mutattunk be és két előadást tartottunk.