

ZÁRÓJELENTÉS

a T038365 OTKA nyilvántartási számú „*Arabidopsis* SCF-SnRK ubiquitin-ligáz komplexek szerkezetének vizsgálata és az alegységek funkcionális analízise“ című projektről

1. A kutatási eredmények rövid összefoglalása

Az *Arabidopsis* SnRK heterotrimer kináz komplex epitópjelölt alegységeinek szuszpenziós sejtkultúrában és növényekben való expressziójával a komplexek alegységszerkezetét és kölcsönhatásait vizsgáltuk. Megállapítottuk, ha a katalitikus AKIN10/11 kináz alegység a PRL1 inhibítor fehérjével való asszociációnak köszönhetően inaktív, nem foszforilált formában van, akkor kölcsönhat a 26S proteasómával de ekkor az AKIN α és β regulátor alegységek jelenléte nem detektálható. Az AKIN-PRL1 kapcsolat hiánya illetve disszociációja az AKIN10/11 alegység autofoszforilálását és aktiválását eredményezi, ekkor a 26S proteasóma mellett az AKIN α és β alegységek valamint a COP9 szignáloszóma is a komplex részét képezi. Ismert, hogy a COP9 szignáloszóma az SCF E3 ubiquitin ligáz komplexeket inaktíválja a kullin alegység deneddylálása révén. Az általunk javasolt modell feltételezi, hogy az SnRK-COP9 kölcsönhatás gátolja a deneddilációt, ezáltal aktiválja az SCF komplexeket, és elősegíti az aktivált SCF-szubsztrát komplexek 26S proteasómához való dokkolását.

Brief summary of results

We investigated the subunit structure and interactions of the heterotrimeric SnRK kinase complex by expressing epitope-tagged subunits in *Arabidopsis* plants and cultured cells. When the catalytic AKIN10/11 kinase subunit is kept in an unphosphorylated inactive form through association with the inhibitor PRL1 protein, the catalytic subunit interacts with the 26S proteasome but the presence of AKIN α and β regulatory subunits cannot be detected in the complex. Dissociation of the AKIN-PRL1 interaction, or the lack of it, results in phosphorylation and activation of the AKIN10/11 subunit which then binds to the 26S proteasome as well as to the AKIN α and β subunits and recruits COP9 signalosome to the holoenzyme complex. It is known that due to its cullin deneddylase activity the COP9 signalosome inactivates SCF E3 ubiquitin ligase complexes. Our results suggest a model in which the SnRK-COP9 interaction abolishes the deneddylase activity of COP9 and results in the formation of active SCF-substrate complexes and might facilitate their docking to the 26S proteasome.

2. Az eredmények részletes ismertetése

2.1 Célkitűzések

Az AKIN10 és AKIN11 szerin-treonin típusú protein kinázok funkcionálisan az élesztő Snf1 protein kináz *Arabidopsis* ortológjai (Hrabak et al., 2003). Élesztőben az Snf1

protein kináz érzékeli a sejten belüli glükóz szint változásait és felelős a szénhidrát/glükóz represszióban részt vevő gének de-represszálásáért. A növényi Snf1-szerű protein kinázok (SnRK) az élesztő Snf1 kinázhoz hasonlóan glükóz reguláltságot mutatnak. A növényi SnRK kinázok heterotrimerikus fehérjekomplexet alkotnak, amely a katalitikus α , a szubsztrát felismerő β és az aktiváló γ alegységekből épül fel (Hardie et al., 1998). Az SnRK kinázok, ellentétben az élesztőben és az emlősökben tapasztaltakkal, ahol egy ún. upstream kináz foszforilálja és ezáltal aktiválja a kináz komplex katalitikus α alegységét, autofoszforilációs aktivitást mutat.

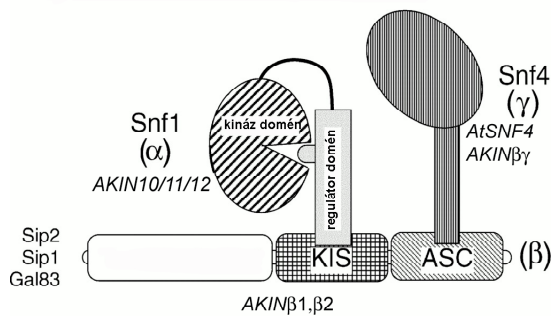
Munkánk célja a növényi szignálátvitelben résztvevő SnRK és SCF ubiquitin ligáz komplexek szerkezetének biokémiai és molekuláris genetikai vizsgálata volt. Kutatási tervünk alapját azok a megfigyelések képezték, melyek a növényi SnRK kinázok kölcsönhatását írták le a 20S proteaszóma α 4/PAD1 alegységgel és az SCF E3 ubiquitin ligáz komplex SKP1/ASK1 alegységével valamint a PRL1 fehérjével (Farrás et al., 2001, Bhalerao et al., 1999). Az SCF (Skp1-Cullin-F-box) E3 enzimkomplexek számos regulátorfehérje stabilitását szabályozzák. A komplexet négy konzervált alegység alkotja. A Cdc53/cullin (cell-division-cycle 53), SKP1 (supressor of the kinetochore protein1), RBX1 (Ring-box protein1) és egy F-box fehérje. A Cdc53/cullin, SKP1 és az RBX1 fehérjék által alkotott "alapegységhez" különböző F-box proteinek kapcsolódnak amelyek az SCF komplexek egyedi szubsztrátfelismerő specificitását biztosítják. A sejtmagban lokalizálódó PRL1 WD40 fehérje gátolja az SnRK kinázok aktivitását és mutációja hormon, cukor és hideg stressz hiperszenzitivitást okoz (Németh et al., 1998). Kísérleti stratégiánk egyrészt a HA és c-Myc epitóppal jelölt SnRK-SCF alegységek növényi sejt kultúrában való kifejeztetésére, a komplexek immunoaffinitás tisztítására és az alegységek tömegspektrometriás azonosítására épült. Másrészt, az azonosított fehérjéket kódoló gének T-DNS inszerciós mutánsainak analízisével az érintett jelátviteli folyamatokat kívántuk vizsgálni. Munkatervünk az alábbi lépéseket tartalmazta:

1. SnRK kináz komplex alegységek, továbbá SCF ubiquitin ligáz komplex alegységek (cullin és Skp1) jelölése epitópokkal és ezeknek kifejeztetése egyedileg ill. páronkénti kombinációkban *Arabidopsis* sejtekben.
2. Az epitóp jelölt SnRK-SCF komplexek kromatográfiás és immunoaffinitás tisztítása, az alegységek azonosítása tömegspektrometriával.
3. T-DNS inszerció izolálása a jellemzett SnRK-SCF komplexek alegységeit kódoló génekben PCR segítségével.
4. A T-DNS inszerciós mutánsok jellemzése: hormon, sejtosztódási és stresszválaszok analízisével és kettős mutáns kombinációk vizsgálatával.

2.2 Epitóppal jelölt alegységek expressziója *Arabidopsis* sejtekben

Az SnRK komplexek tisztításához és a kölcsönható fehérjék azonosításához a már ismert alegységek epitóppal jelölt formáját expresszáló sejt vonalakat kellett létrehozunk. Munkánk során *Agrobacterium* segítségével juttatuk a hemagglutinin (HA) illetve c-myc epitóppal jelölt fehérjéket expresszáló bináris vektorokat *Arabidopsis* szuszpenziós sejt kultúrába. Először az AKIN10 és AKIN11 katalitikus α alegységek N- és C-terminális c-myc jelölt formáit kíséreltük meg kifejeztetni. C-myc-AKIN10 fehérjét expresszáló kultúrát sikerült előállítanunk de az expresszió szintje az alkalmazott erős 35S promóter ellenére

alacsony volt (2002. évi szakmai részjelentés 1. ábra). Az AKIN11-c-myc fehérje kifejeztetése során pedig nem sikerült stabil sejt kultúrát létrehozni. Az AKIN fehérjék alacsony szintű ill. nem detektálható kifejeződésének egyik lehetséges magyarázata az, hogy az emlős és élesztő Snf1 kinázokkal ellentétben, melyeket egy upstream kináz aktivál, a növényi katalitikus α alegységek autofoszforilálódnak és ezáltal magukat aktiválni képesek. Az SnRK kinázok jelátviteli folyamatokban betöltött kritikus szerepe miatt a növényi sejt számára a kináz aktív formájának konstitutív jelenléte nem kívánatos lehet.



1. ábra. Az eukarióta Snf1/AMPK kináz szerkezete. Az ábrán dőlt betűkkel jelöltük az alegységek Arabidopsis ortológjait.

Az élesztő és emlős Snf1/AMPK kinázokhoz hasonlóan a növényi SnRK kinázok is heterotrimerikus komplexet képeznek (1. ábra). Az *Arabidopsis* genom három katalitikus α alegységet (az AKIN12 pszeudogén), kettő szubsztrátkötő és „scaffolding” β alegységet valamint egy regulátor γ alegységet kódol (Kleinow et al., 2000). Ez a szerkezeti felépítés lehetővé tette, hogy a kölcsönhatók vizsgálatához a nehezen kifejezhető kináz alegységek helyett a komplex szubsztrátkötő és

regulátor alegységeinek építő jelölt formáit használjuk. Az N-terminálisán HA epitóppal jelölt AKIN α 2/SIP fehérjét sikeresen expresszáztattuk *Arabidopsis* sejtekben. Mivel a konstitutíven kifejeződő HA-AKIN α 2/SIP fehérjével koimmunprecipitálni lehetett az AKIN10/11 kinázokat (2002. évi szakmai részjelentés 4. ábra), a stabil sejt kultúra megfelelő kiindulási anyagot szolgáltatott a fehérjekomplexek alegységeinek biokémiai vizsgálatához. Az AKIN10/11 és AKIN α 2/SIP fehérjéken kívül az összes alegység valamint a kináz kölcsönható partner PRL1 fehérje építő jelölt változatát expresszáló vektorokat is készítettünk és ezekkel transzformáns növényi sejt vonalakat hoztunk létre. A fehérjék kifejeződését és stabilitását immunofluoreszcens mikroszkópiával (PRL1, AKIN α 2, AtSNF4/AKIN α) és western hibridizációs technikával ellenőriztük. A konstitutív 35S promotert tartalmazó konstrukciók mellett készítettünk ösztadiol-szabályozott promotert tartalmazó vektorokat is. Annak érdekében, hogy az építő-jelölt proteinek a vad típusú fehérjéhez hasonló expressziós szinten fejezzék ki megklónóztuk a gének promotér régióját és azokat a kódoló cDNS szakaszok elé építettük. Végezetül az AKIN10/11 kinázok ATP-kötő régiójában és aktiváló T-loop régiójában mutációt hordozó katalitikusan inaktív fehérjék építő-jelölt változatainak létrehozásán dolgoztunk (2003. évi szakmai részjelentés 2. Táblázat).

Korábbi biokémiai eredményeinkre támaszkodva valamint irodalmi adatokból prediktálható kölcsönhatásokat figyelembe véve a HA/c-myc epitóppal jelölt gének körébe SCF ubiquitin ligáz alegységeket is bevontunk. Az *Arabidopsis* genomban 6 cullin gént azonosítottunk. A cullin fehérjéket kódoló teljes hosszúságú cDNS szekvenciák nagy mérete miatt az eredeti exon-intron szerkezetet tartalmazó genomi szekvenciának *Arabidopsis* genomi fágkönyvtárból történő izolálását alkalmaztuk. Klónozási stratégiánk során az utolsó exonhoz fuzionáltatott HA és c-myc epitóp szekvencia biztosítja majd az immunológiai detektálás lehetőségét. A konstitutív kifejeződést CaMV35S promotérral, míg az indukálható génkifejeződést a növényi rendszerekben széles körben alkalmazott ún. ösztadiol indukálható promotér szekvenciának a genomi szekvenciával való egybeépítésével kívántuk

elérni. A 6 cullin génből három esetében rendelkezünk C-terminális HA és c-myc epitóp jelölt konstrukciókkal. Az *Arabidopsis* sejtkultúrában történő expresszió során a *cullin1* és *cullin2* gének esetében kaptunk a CaMV35S promóter szabályzása alatt magas szintű kifejeződést. Az *Arabidopsis* genom által kódolt 19 ASK/SKP fehérjék közül kettő C-terminálisan epitóp-jelölt változatát is elkészítettük (1. Táblázat).

Protein	Konstrukció	Promóter	Transzformálás
PRL1 At4g15900	cDNS+HA és c-myc epitóp ----- gDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható -Natív promóter ----- -Ösztradiol indukálható -Natív promóter	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény - Arabidopsis <i>pr11</i> null mutáns növény
AKIN10 At3g01090	cDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható -Natív promóter-GUS	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
AKIN11 At3g29160	cDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható -Natív promóter-GUS	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
AKIN□1 At5g21170	cDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
AKIN□2 At4g16360	cDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
AtSNF4/ AKIN□□ At1g09020	cDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
Cullin1 At4g02570	gDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Natív promóter	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
Cullin2 At1g02980	gDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S	-Sejtszuszpenzió
Cullin3 At1g43140	gDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S	-Arabidopsis Col-0 növény
SKP1/ASK1 At1g75950	cDNS+HA és c-myc epitóp gDNS+HA és c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S -Ösztradiol indukálható -Natív promóter	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény
ASK2	cDNS+ c-myc epitóp	-konstitutív CaMV35S	-Sejtszuszpenzió -Arabidopsis Col-0 növény

1. Táblázat. Epitóp-jelölt fehérjék növényi expressziójához készített bináris vektorok összefoglalása. A táblázatban feltüntettük, hogy az adott konstrukció elkészítéséhez a fehérjét kódoló cDNS, illetve a genomi DNS (gDNS) szakaszt jelöltük hemagglutinin (HA) illetve c-myc epitóppal. Kövér betűkkel szedtük azokat a fehérjéket, amelyek expressziója sikeres volt.

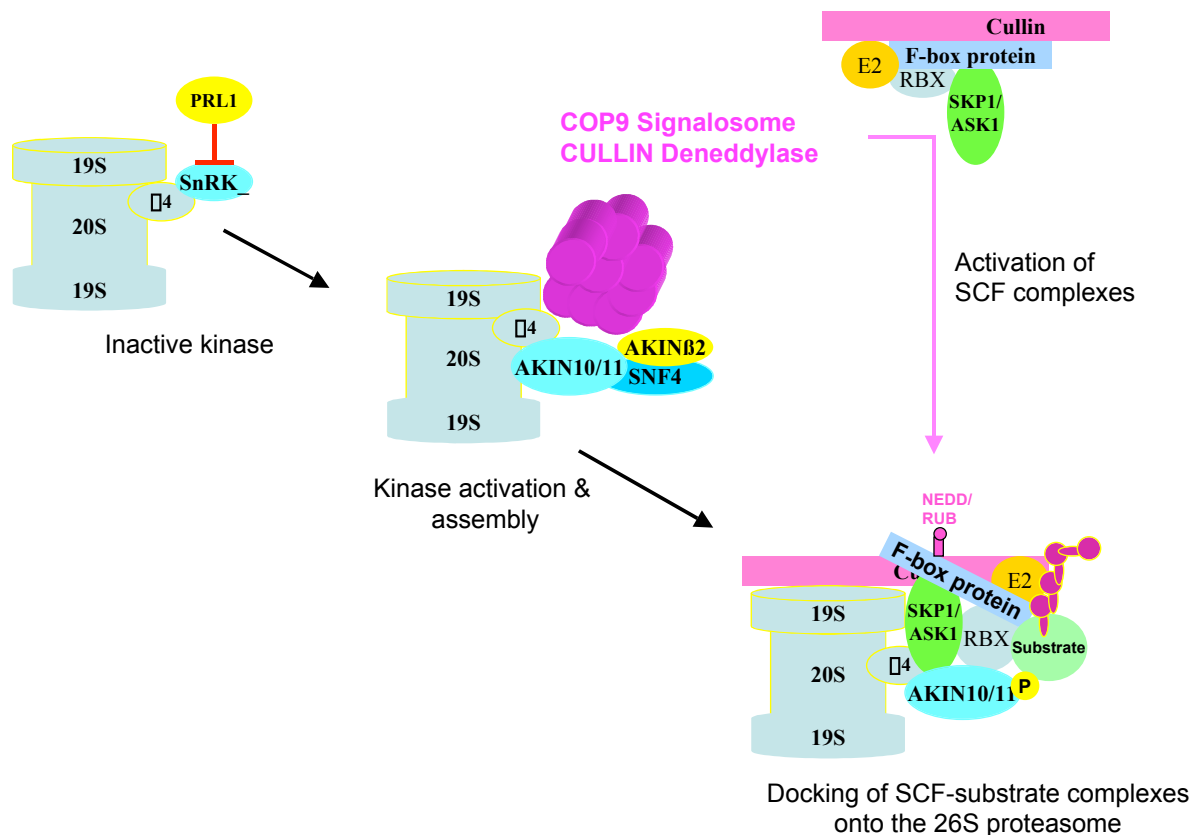
2.3 Affinitástisztított komplexek alegységszerkezetének immunológiai és tömegspektrometriás vizsgálata

A kinázkomplexek tisztításához először a HA-AKIN□2/SIP fehérjét expresszáló sejtvonalat választottuk. A sejtekből fehérje extraktumot készítettünk amelyet közvetlenül □-HA ellenanyagot hordozó mátrixszal inkubáltunk. Az immunprecipitált fehérjék HA peptiddel való elúciója után a HA-AKIN□2/SIP fehérje SnRK kinázzal való asszociációját anti-NPK5 ellenanyaggal detektáltuk amely a teljes hosszúságú dohány SnRK kináz fehérje ellen készült és felismeri az *Arabidopsis* AKIN10/11 kinázokat. Az *Arabidopsis* SnRK kináz ill. kinázok koimmunprecipitálódtak a HA-AKIN□2/SIP fehérjével (2002. évi szakmai részjelentés 5/B ábra). Megvizsgáltuk továbbá, hogy a HA-AKIN□2/SIP fehérjével stabil komplexet alkotó kináz(ok) funkcionálisan aktív formában vannak-e. Ezt egyrészt az élesztő SNF1 kináz aktiváló foszforilációs helyével szemben termeltetett specifikus antifoszfopeptid antitest (PT210) segítségével vizsgáltuk. A HA-AKIN□2/SIP vonalból anti-HA ellenanyaggal

immunprecipitált mintában a PT210 antitest foszforilált SnRK kinázt detektált (2002. évi szakmai részjelentés 6/A ábra). Másrészt *in vitro* foszforilációs kísérletben analizáltuk a HA-AKIN Δ 2/SIP asszociált kináz(ok) aktivitását. Szubsztrátként a növényi SnRK kinázok foszforilációs felismerőhelyének peptidszekvenciáját (a szacharózfoszfát szintáz enzim KD katalitikus doménjét) a tioredoxin fehérjével C-terminális fúzióban (TRX-KD) használtuk (2002. évi szakmai részjelentés 6/B ábra). Az immunprecipitátumban detektált TRX-KD foszforilációs aktivitás arra utalt, hogy az HA-AKIN Δ 2/SIP fehérjével asszociált kináz funkcionális aktív. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az aktív kinázt tartalmazó immunprecipitátumban a proteaszóma jelenléte kimutatható-e. A 2002. évi szakmai részjelentés 7. ábra ábrán látható, hogy a proteaszóma 20S \square -alegységét felismerő ellenanyaggal készült immunoblot proteaszóma asszociáció jelenlétét valószínűsíti. A HA-AKIN Δ 2/SIP fehérje 20S proteaszóma asszociációjának ellenőrzéséhez megismételtük a HA mátrixon való affinitás tisztítást, de az immunoprecipitációt megelőzően a fehérje extraktumot DEAE-Affigel Blue ioncserélő kromatográfiával előfrakcionáltuk (2002. évi szakmai részjelentés 8. ábra). A kromatográfiás frakciókból immunprecipitált fehérjéket \square -20S ellenanyaggal teszteltük melynek eredménye megerősítette az AKIN Δ 2/SIP fehérje proteaszóma asszociációját (2002. évi szakmai részjelentés 9. ábra). Az ismételt kísérlet során a rendelkezésünkre álló immunológiai reagensek segítségével tovább elemeztük az izolált fehérjekomplex alegységszerkezetét és specifikus ellenanyagok segítségével kimutattuk a SNF4/AKIN \square regulátor fehérje, valamint a COP9 szignoszóma CSN8 alegységének a jelenlétét is (2003. évi szakmai részjelentés 1. ábra).

Immunológiai reagensekkel szintén elemeztük az SnRK kináz aktivitását gátló PRL1 komplex szerkezetét is. A biokémiai frakcionálás során kiindulási anyagunk a HA epitóppal jelölt PRL1 fehérjét konstitutívan expresszáló *prl1* null mutáns növény volt. A komponensek azonosításának összefoglaló adataiból kitűnik, hogy a kinázt aktiváló SnRK \square alegység valamint SCF komplex elemei egyaránt hiányoznak a komplexből és az SnRK fehérje aktív, foszforilált formája sem mutatható ki (2003. évi szakmai részjelentés 2. ábra).

Az általunk detektált kölcsönhatások különböző SnRK-proteaszóma komplexek jelenlétére utalnak, amelyek feltételezett szerkezetét a 2. ábrán foglaltuk össze. Az AKIN10/11 interaktor PRL1 fehérje gátolja a kináz aktivitását és jelenlegi eredményeink szerint a 26S proteaszómával kapcsolt kináz komplexben helyettesítheti a heterotrimer AKIN \square és SNF4/AKIN \square alegységét, valamint lefedti a kináz fehérjének az SCF komplex ASK1/SKP1 alegységével kölcsönható régióját is. A PRL1 inhibítor fehérje disszociációját követően a kináz aktiválódik és asszociál az SnRK komplex regulátor AKIN \square és SNF4/AKIN \square alegységeivel. Ebben a komplexben a rendelkezésünkre álló ellenanyagokkal nem lehetett SCF alegységek (SKP1/ASK1 és CUL1) jelenlétét kimutatni. Detektálni tudtuk azonban a COP9 szignoszóma CSN8/FUS4 alegységét, melynek alapján feltételezhető a teljes szignoszóma jelenléte. A COP9 szignoszóma egyik ismert biológiai aktivitása a cullin fehérjék poszt-transzlációs módosításának megváltoztatása, deneddilálása, és ezáltal az SCF komplexek aktivitásának szabályozása. A modell szerint lehetséges, hogy az SnRK komplex a COP9 deneddilációs aktivitásának modulálásával elősegíti az aktívált (neddilált) SCF komplexek proteaszómához történő kapcsolódását. Eltérő struktúrájú SnRK-proteaszóma komplexek kialakulásának lehetőségét támasztja alá az AKIN10/11 fehérjék kölcsönhatásainak térképezése is. Az aktiváló SNF4/AKIN \square alegység, a PRL1 inhibítor fehérje valamint az SKP1/ASK1 SCF komplex alegység az AKIN10/11 fehérjék egyazon régiójához kötődik, kompetitív módon.



2. ábra. Az SnRK-proteaszóma komplexek szerkezete.

A HA-PRL1 és HA-AKIN β 2/SIP fehérjéket expresszáló növény és sejt vonal megfelelő kiindulási anyag volt a komplexek preparatív tisztítására és alegységszerkezetük tömegspektrometriás vizsgálatára. Az ioncserélő kromatográfiás és immunoaffinitás kromatográfiás frakcionálási lépések során a fehérjék mennyiségét koloidális Coomassie-festéssel ellenőriztük. A kapott fehérjemintázatok nagyfokú komplexitása (2003. évi szakmai részjelentés 3. ábra) szükségessé tette, hogy az eredeti megközelítésünk helyett (a tisztított komplexek 2-dimenziós gél elektroforézisét követően a komponensek proteolitikus emésztése és MALDI analízise) a nano LC-MS/MS technikát alkalmazzuk, melynek során a gélben történő proteolitikus emésztést követően a kinyert peptideket nagynyomású folyadékkromatográfiával előfrakcionáljuk a tömegspektrometriás analízist megelőzően.

A *prl1* null mutáns növényben kifejeztetett HA-PRL1 fehérjét termelő növényből készített fehérje extraktumot ioncserélő oszlopon kromatografáltuk, majd anti-HA affinitás mátrixon tisztítottuk tovább azokat a kromatográfiás frakciókat, amelyekben western blot technikával kimutatható volt a HA-PRL1 fehérje jelenléte. A fehérjéket tripszinnel emésztettük, majd a peptidek kétdimenziós nagynyomású folyadékkromatográfiás szeparálása után Q-TOF spektrometriával elemeztük. Az azonosított fehérjék adatait, amit a 2004. évi szakmai részjelentés 2. számú táblázata tartalmaz, kiegészítve a 2. Táblázatban foglaltuk össze.

Annotation/Description	MW	Coverage %	Peptides	AGI Nr.
Gene 5 promoter-binding factor G5BF	42619.8	20.1	5	At1g09340
LOS2 Involved in light-dependent cold tolerance and encodes an enolase	47719.3	15.8	4	At2g36530
LOS1,translation elongation factor 2-like protein	94246.5	5.2	3	At1g56070
PRL1	54009.5	8.0	3	At4g15900
AMP-dependent synthetase and ligase family protein	55544.3	4.9	2	At3g48990
WD-40 repeat protein (AtArcA)	35747.6	9.2	2	At1g18080
PRL2	53568.3	5.8	2	At3g16650
DNAI heat shock N-terminal domain-containing protein	63521.9	3.9	2	At4g02100
peptidase M1 family protein, similar to SPIP04825 Aminopeptidase N99841.0	48216.0	5.6	2	At1g63770
helicase, putative, similar to SPIQ03468 Excision repair protein ERCC-6	62475.6	3.1	2	At1g03750
KH domain-containing protein, various predicted RNA binding proteins	62745.6	4.2	2	At5g09560
actin 11 (ACT11)	41674.6	5.6	2	At3g12110
F-box family protein, contains Pfam:PF00646 F-box domain	78065.7	3.5	2	At1g20940
SPla/RY anodine receptor (SPRY) domain-containing protein, low similarity to RanBPM	38892.2	6.9	2	At4g09250
calmodulin-binding family protein, similar to SF16 protein	28491.0	7.2	2	At2g33990
leucine-rich repeat family protein	75926.8	3.5	2	At1g07390
pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, low similarity to fertility restorer	70187.7	3.3	2	At5g40400
ATMPK9, MAP KINASE 9	70770.7	3.2	2	At3g18040
dehydration-responsive family protein	69991.8	4.1	2	At2g40280
transcription factor jumonji (jmj) family protein / zinc finger (C5HC2 type)	99682.0	2.9	2	At4g20400

2. Táblázat. A *prr1* null mutáns *Arabidopsis* növényekben expresszált HA-PRL1 fehérjével kölcsönható proteinek tömegspektrometriás azonosítása.

A PRL1 fehérjén kívül számos, az SnRK/PRL1-jelátviteli útban feltehetően szerepet játszó és a sejtmagban lokalizálódó fehérje és transzkripciós faktor jelenléte volt kimutatható az affinitástisztított frakcióban. Az azonosított fehérjék nagy száma azonban arra enged következtetni, hogy ezek túlnyomó többsége feltehetően az agaróz mátrixszal ill. az immunglobulinnal nonspecifikusan hatnak kölcsön. Újabb kísérleteink szerint az affinitás oszlophoz asszociált fehérjék javarésze magasabb sókoncentrációjú pufferrel eltávolítható, de az elúciót követő gliceringrádiens centrifugálással a végső preparátum homogenitása szintén növelhető.

Az SnRK komplex szubsztrátkötő AKIN2 alegységével kölcsönható proteinek azonosításához a HA-epitóppal jelölt fehérjét expresszáló *Arabidopsis* sejtkultúrából indultunk ki. A HA-AKIN2 komplex tisztítását a HA-PRL1 fehérjénél leírtakhoz hasonlóan végeztük el, azonban két párhuzamos preparálást végeztünk. Az immunoaffinitási kromatográfia során a megkötött fehérjéket hordozó anti-HA mátrixot az első esetben 150 mM, a második esetben 300 mM sókoncentrációjú pufferrel mostuk az elúciós lépést megelőzően. Az eluált fehérjék tripszinnel történő emésztését követően az alkotóelemeket tömegspektrometriával azonosítottuk (2004. évi szakmai részjelentés 3. táblázat).

Annotation/Description	MW	Coverage %	Peptides	AGI number
Proteins eluted after 150 mM NaCl wash				
ATCDC48, CDC48, CDC48A, CELL DIVISION CYCLE 48	89393.4	21.5	12	
ATCDC48, CDC48, CDC48A, CELL DIVISION CYCLE 48	89958.0	18.9	11	
Potential AKIN substrate protein	93002.7	13.7	10	
(EMBRYO DEFECTIVE 1395) SAHH	53378.5	26.2	10	
gi 26454671 (1) sus1_arath sucrose synthase (sucrose-udp)	92798.4	13.3	9	
gi 6630743 (1) cdc48 - like protein [arabidopsis	90340.5	13.3	8	
PRL2-binding protein	73629.3	13.9	7	
gi 166830 (1) 20s proteasome alpha subunit f1	30476.0	16.2	3	
gi 3421082 (1) 20s proteasome alpha subunit d2	27324.1	12.8	2	
gi 2511574 (1) 20s proteasome alpha subunit b	25701.2	11.9	2	
gi 3421072 (1) 20s proteasome alpha subunit a2	27350.1	8.5	2	
gi 1729444 (1) snf1-related protein kinase AKIN11	58689.5	5.1	2	
gi 3421094 (1) 20s proteasome alpha subunit f2	30409.9	12.6	2	
gi 7019643 (1) nuclear receptor binding factor-like	39940.9	7.4	2	
calcium-dependent protein kinase,PRL1-interactor CRK1	66991.4	4.0	2	
Proteins eluted after 300 mM NaCl wash				
gi 7769868 (1) PEP carboxylase , potential AKIN substrate	110285.9	35.8	27	
ATCDC48, CDC48, CDC48A, CELL DIVISION CYCLE 48	89393.4	25.1	16	At3g09840
(EMBRYO DEFECTIVE 1395) SAHH	53378.5	35.7	15	At4g13940
Cell division cycle protein 48 homolog	89958.0	20.9	14	At5g03340
gi 6056373 elongation factor ef-2 [imported]	94246.5	21.2	14	
gi 6630743 cdc48 - like protein Arabidopsis	90340.5	16.7	11	
possible AKIN-binding protein	37836.1	44.2	11	At3g09820
ADENOSINE KINASE 2, ADK2	37846.1	43.8	11	At5g03300
gi 42572347 adenosine kinase 1 (ADK1) / adenosine	33326.1	50.3	11	
gi 7649359 sucrose synthase, potential AKIN substrate	93002.7	15.2	11	At3g43190
gi 9293955 s-adenosyl-l-homocysteinas -related	53159.2	21.9	10	At3g23810
gi 3860247 dtdp-glucose 4-6-dehydratase -related	43637.9	33.9	10	At1g08200
gi 26454671 sus1_arath sucrose synthase (sucrose-udp)	92798.4	12.4	9	
gi 22656 nitrilase 2 [arabidopsis thaliana	37153.1	37.2	8	
gi 8953382 dead box rna helicase rh15 [arabidopsis	48384.5	20.8	8	
gi 8953379 dead box rna helicase rh15-like	49317.6	20.5	8	
gi 9502169 luminal binding protein 1 precursor	73629.3	13.9	7	At5g28540
gi 10176805 20s proteasome alpha subunit a1	27294.0	34.1	7	
SHD, SHEPHERD	94204.0	10.6	7	At4g24190
gi 2511574 20s proteasome alpha subunit b	25701.2	34.9	6	
gi 3421072 20s proteasome alpha subunit a2	27350.1	26.8	6	
RAB1C	24482.1	29.4	5	At4g17530
RAB1C	22318.2	32.2	5	At4g17530
gi 6630731 dead/deah box helicase, putative	55384.0	15.3	5	
gi 1915974 pfbk type carbohydrate kinase protein	37628.1	15.9	5	
gi 16554 eukaryotic translation initiation	46704.5	13.3	5	
gi 16556 eukaryotic translation initiation	46762.5	13.3	5	
gi 3421087 20s proteasome alpha subunit e1	25947.2	32.5	5	
gi 12323023 20s proteasome beta subunit g1	27651.4	25.2	4	
gi 16445 20s proteasome alpha subunit d	27337.1	23.6	4	

3. Táblázat. *Arabidopsis* sejtuszuszenzióban expresszált HA-AKIN \square 2/SIP fehérje komplex tömegspektrometriás azonosítása az affinitás matrix 150mM illetve 300mM NaCl-al történő mosását követően.

Az azonosított fehérjék között találjuk az AKIN10/11 kinázokat és ezek potenciális szubsztrátjait és kölcsönhatóit, a PRL kötő fehérjét és a PRL1-interaktor CRK1 kinázt, valamint proteaszóma alegységeket. Szintén kimutattuk az Ufd1-CDC48 ERAD degradációs mechanizmusban szerepet játszó AtCDC48 fehérjét egyezésben korábbi élesztő kettőshibrid kísérleteink eredményével, amely az Ufd1 fehérjét mint PRL1 kölcsönhatót azonosította. Eredményeink arra utalnak, hogy az SnRK komplex alegységeinek expressziójával kapcsolatos kezdeti nehézségeket sikerült megoldanunk, a növényi fehérjepreparátumok frakcionálását és az epitóppal jelölt fehérjék immunoaffinitás tisztítását pedig úgy módosítanunk, hogy a tömegspektrometriás analízis során releváns fehérjéket azonosítsunk.

2.4 T-DNS mutáns növények azonosítása és jellemzése

További molekuláris és genetikai vizsgálatok céljából Koncz Csaba kölni T-DNS mutáns kollekciónak szűrésén túl a nyilvánosan hozzáférhető gyűjteményekből (Syngenta, Salk, Gabi-KAT) T-DNS inszerciós mutáns növényeket szereztünk be. A kölni mutáns kollekción esetében a gyűjteményből az általunk tanulmányozni kívánt génben T-DNS inszerciót hordozó növényt PCR technikával azonosítottuk, a gének környezetére tervezett primerek és a T-DNS inszerciót hordozó növényekből készített DNS „pool”-ok felhasználásával. Számos, az SnRK komplex alegységeiben illetve a növényi SCF komplex alkotóelemeiben T-DNS inszerciót hordozó mutáns *Arabidopsis* növényt vizsgáltunk meg. A mutánsok élettani vizsgálatát megelőzően elvégeztük genetikai és molekuláris biológiai analízisüket (a T-DNS inszerció helyének pontos térképezése, a T-DNS inszerció kópiaszámának Southern hibridizációval történő megállapítása, homozigóta növények azonosítása) és a vad típusú illetve a feltételezhetően kölcsönható partnereket kódoló génekben mutációt tartalmazó növények keresztezéssel történő létrehozásán dolgoztunk. Az AKIN10, AKIN11, AKIN□1, AKIN□2, AtSNF4/AKIN□, cullin és ASK inszerciós mutánsokra vonatkozó adatokat (azonosítási szám, mutáns vonalak azonosítója és az eddig megfigyelt fenotípus) a 2003. évi szakmai részjelentésben bemutatott adatokat kiegészítve a 4. Táblázat tartalmazza.

Gén	Acc. Nr.	Jellemzés
AKIN10 At2g39800	SALK 127939	A fenotípus analízis jelenlegi szakaszában nem rendelkezünk elégséges adattal.
AKIN11 At3g29160		A génben T-DNS inszerciót hordozó mutáns növényt egyetlen gyűjtemény sem tartalmaz, feltételezhető, hogy a meiózisban elengedhetetlenül fontos a jelenléte.
AKIN12 At5g39440	SALK 053616 SALK 053868 SALK 021965	Vad típusú növényben transzkript nem mutatható ki, az <i>AKIN12</i> gen valószínűleg pszeudogén. A mutánsnak nincs látható fenotípusa
AKIN□1 At5g21170	GABI 235B06 SALK 008325	A fenotípus analízis jelenlegi szakaszában nem rendelkezünk elégséges adattal
AKIN□2 At4g16360	KONCZ pool 875 SALK 052521 SALK 037416	A mutans himsteril utódokat szegregál. A fenotípusa <i>Snf4</i> mutánséhoz hasonlít
AKIN□/AtSNF4 At1g09020	GABI 346E09	A szegregációs arány 1:1 és 2:1 között mozog, amely a mutáns hím és női gaméták meiotikus transzmissziójának csökkent mértékére vezethető vissza. Az összes mutáns

	<i>SALK074</i> 210 <i>SAIL R6</i> <i>B11</i>	részleges hímsterilitást es embrioletalitást mutat. Nem sikerült homozigóta vonalat azonosítanunk.
CUL1 At4g02570	<i>Koncz</i> 2513-8 <i>SALK</i> 129379	Nem sikerült homozigótát izolálni, embrioletalis.
CUL2 At1g02980	<i>SALK_01</i> 2144	A mutáns vad típusú fenotípust mutat
CUL3 At1g43140	<i>Koncz898</i> -16	Pszudogén. A mutáns vad típusú fenotípust mutat
CUL4 At1g26830	<i>Koncz</i> 39058-15 <i>SALK</i> 050756 <i>SALK</i> 04663	A mutáns vad típusú fenotípust mutat
CUL5 At1g69670	<i>SALK_09</i> 8014	A mutáns vad típusú fenotípust mutat
CUL6 At5g46210	<i>Koncz</i> 42460 <i>Koncz</i> 57891	A mutáns vad típusú fenotípust mutat
ASK1/SKP1-1 At1g75950	<i>Koncz</i> 37892	Hímsteril fenotípust mutat.
ASK3-SKP1-3 At2g25700	<i>Koncz</i> 4585	Nem sikerült homozigótát izolálni, him gametofita letális fenotípus valószínűsíthető.
ASK4 At1g20140	<i>SALK</i> 012486	Az inszerció a gén promoterébe lokalizálódik, a gén expresszióját nem befolyásolja. A mutáns vad típusú fenotípust mutat
ASK14 At2g03170	<i>SAIL</i> 358C01	A mutáns vad típusú fenotípust mutat
ASK19 At2g03160	<i>GABI</i> 120C04 <i>SALK</i> 054269	A mutáns vad típusú fenotípust mutat

4. Táblázat. SnRK kináz és SCF ubiquitin ligáz komplexek elegységeiben T-DNA mutációt tartalmazó növények azonosítása és fenotípusa.

3. Tudományos közlemények jegyzéke

Fülöp K, Pettkó-Szandtner A, Magyar Z, Miskolczi P, Kondorosi E, Dudits D, Bakó L (2005) The *Medicago* CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J* **42**:810-820.

4. A kutatás személyi feltételeiben beállt változások, a projekt terminálásának indoklása.

A pályázat harmadik évétől Dr. Oberschall Attila témavezető és Dr. Bakó László résztvevő megszakításokkal már külföldön dolgozott. Ezért 2005. év februárjában először a pályázat egy éves felfüggesztését kértük. Kérelmünk 2005. júliusában történt kedvező elbírálását követően a külföldi munkavégzés állandósulása valamint a munkaviszonyok bizonytalansága ill. megszűnése miatt pályázatunk végleges lezárását kértük. A pályázat harmadik résztvevője, Ökrész László magyarországi munkaviszonya 2005. december 31.-én megszűnt,

Dr. Oberschall Attila magyarországi munkaviszonya pedig előreláthatólag 2006. június 30.-án szűnik meg.

5. Irodalomjegyzék

Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K. and Harmon, A. C. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* **132**: 666-680.

Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/Snf1 protein kinase subfamily: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:821-855.

Farrás, R., Ferrando, A., Jásik, J., Ökrész, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J. and and Koncz, C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* **20**: 2742-2756.

Bhalerao R, Salchert K, Bakó L, Ökrész L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell 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.

Németh, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kálmán, Zs., Stankovic-Stangeland, B., Bakó, L., Mathur, J., Ökrész, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Rédei, G. P., Schell, J. and Koncz, C. (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development.* **12**: 3959-3073.

Kleinow, T., Bhalerao, R., Breuer, F., Umeda, M., Salchert, K., and Koncz, C. (2000) Functional identification of an *Arabidopsis* Snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant J.* **23**: 115-122.