

XXXI. OTDK

Biológia Szekció

Egy CDPK-szerű protein kináz (CRK7) vizsgálata *Arabidopsis thaliana*-ban

Készítette: Urbancsok János
Biológus MSc, II. Évfolyam

Szegedi Tudományegyetem
Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Cséplő Ágnes
Belső konzulens: Dr. Pécsváradi Attila



2012.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2. 1. Arabidopsis thaliana (lúdfű)	5
2. 1. 1. Rövid története, szervezettani felépítése	5
2. 1. 2. Arabidopsis mint a növényi genetika modellorganizmusa	5
2. 2. A Ca²⁺ ion mint másodlagos jelátviteli molekula.....	6
2. 3. Az Arabidopsis thaliana CDPK-SnRK szupercsalád	6
2. 3. 1. A szupercsalád általános jellemzése	6
2. 3. 2. A CDPK család bemutatása.....	8
2. 3. 3. CaMK és CCaMK	8
2. 3. 4. CRK család	9
2. 4. A CRK7 felépítése, jellemzése	11
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	12
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
4. 1. Vegyszerek, műszerek, enzimek és egyéb készítmények	13
4. 2. Módszerek.....	13
4. 2. 1. Bakteriális technikák.....	13
4. 2. 1. 1. Kompetens sejt transzformálása	13
4. 2. 1. 2. Baktériumok szaporítása	13
4. 2. 1. 3. Agrobacterium háromszülős konjugációja („triparentális mating”, Cindy és mtsai, 1994)	13
4. 2. 2. Növényi anyagon alkalmazott technikák.....	14
4. 2. 2. 1. Arabidopsis thaliana magvak felületi sterilizése, kirakása táptalajra	14
4. 2. 2. 2. Arabidopsis sejtszuszpenzió Agrobacterium-mal történő transzformációja	14
4. 2. 2. 3. Arabidopsis thaliana virágzat infiltrációs transzformálása (Clough és mtsai, 1998).....	15
4. 2. 2. 4. Lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM).....	15
4. 2. 3. Molekuláris biológia módszerek	15
4. 2. 3. 1. Plazmid DNS tisztítása baktérium sejtéből	15
4. 2. 3. 2. Plazmid DNS restrikciós emésztése.....	16
4. 2. 3. 3. DNS fragment tisztítása agaróz gélből.....	16

4. 2. 3. 4. Tisztított DNS fragmentek ligálása.....	16
4. 2. 3. 5. LR Klonáz reakció	16
4. 2. 3. 6. Növényi teljes RNS tisztítás	16
4. 2. 3. 7. Növényi teljes DNS tisztítás	17
4. 2. 4. PCR technikák.....	17
4. 2. 4. 1. Kolónia PCR.....	17
4. 2. 4. 2. Real-Time PCR.....	17
4. 2. 5. Összetett molekuláris biológiai módszerek.....	17
4. 2. 5. 1. CRK7 protein kináz tisztítása baktériumból.....	17
4. 2. 5. 2. Western-blot analízis.....	19
4. 2. 5. 3. Radioaktív kináz aktivitás vizsgálat („kináz assay”)	19
4. 2. 5. 4. Differenciális centrifugálás	20
4. 2. 6. Bioinformatikai alkalmazások	20
5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	21
5. 1. A CRK7 fehérje túltermeltetése bakteriális expressziós rendszerben	21
5. 1. 1. A CRK7 cDNS klónozása prokarióta expressziós vektorba.....	21
5. 1. 2. CRK7 protein kináz tisztítása baktériumból	23
5. 2. Radioaktív kináz-aktivitás („kináz assay”) vizsgálat tisztított CRK7 fehérjével	25
5. 3. A CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációjának vizsgálata <i>A. thaliana</i> (Col-0) növényben és <i>A. thaliana</i> (Col-0) sejtszuspenzióban	26
5. 3. 1. A CRK7 cDNS stop kodon PCR alapú módosítása	26
5. 3. 2. CRK7-EcoRV No Stop cDNS bináris expressziós vektorba klónozása Gateway technológia felhasználásával	27
5. 3. 3. Lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM) vizsgálat	29
5. 3. 4. A CRK7-GFP lokalizáció kimutatása differenciális centrifugálást követő Western-blot vizsgálattal	32
5. 4. A CRK7-es gén biológiai szerepének kutatása	32
5. 4. 1. T-DNS inszerciót tartalmazó homozigóta mutáns vizsgálata.....	32
5. 4. 2. Real-Time PCR (QRT) vizsgálat	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	35
7. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	36
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	39
9. NYILATKOZAT.....	40

1. Bevezetés

Az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) a genetika és molekuláris biológia egyik leggyakrabban alkalmazott modellorganizmusa. Kis genom mérete és rövid generációs ideje alkalmassá teszi genetikai kapcsoltsági térképek készítésére, valamint génfunkciók azonosítására. A magasabbrendű eukarióta élőlényekben a Ca^{2+} fontos szerepet játszik a sejten belüli jelátvitelben. A növények helyhez kötött életmódjuk miatt különböző válaszmechanizmusokat fejlesztettek ki a biotikus és abiotikus stressz hatásokkal szemben, ennek köszönhetően könnyebben alkalmazkodnak a megváltozott környezeti feltételekhez. A Ca^{2+} szignál térbeli és időbeli mintázatában rejlő információt a kalcium-kötő fehérjék segítenek továbbítani. Lúdfűben 34 Ca^{2+} -függő protein kinázt (CDPK) azonosítottak, melyek a másodlagos jelátviteli molekulát megkötik, majd további fehérjéket aktiválnak (Hrabak és mtsai, 2003).

Szekvencia-homológia alapján lúdfűben nyolc feltételezett CRK, vagyis CDPK-szerű protein kináz található. A CRK családba tartozó fehérjék kizárólag növényekben fordulnak elő. Szerkezetileg némileg eltérnek a CDPK fehérjéktől, ugyanis a C-terminális kalmodulin-szerű funkcionális egységén található Ca^{2+} -kötő EF motívumok módosultak, így valószínűleg nem képesek a kalciumot megkötni (Hrabak és mtsai, 2003). A CRK-k biológiai funkciójáról meglehetősen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre.

Munkám során biokémiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével igyekeztem minél több információt gyűjteni az általam vizsgált CRK7 protein kinázzról. Baktériumban túltermeltettem a His₆ (hisztidin) jelöléssel ellátott CRK7 fehérjét, affinitás tisztítottam Ni-NTA agarózt felhasználva, majd kináz aktivitás vizsgálatot végeztem. Lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM) és differenciális centrifugálást követő Western analízis segítségével tanulmányoztam a CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációját *A. thaliana* sejtszuspenzióban és *A. thaliana* növényben.

A CRK7 gén funkciójának megállapításához egy T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns vonalat használtam, illetve Real-time PCR-t (QRT) alkalmazva azt vizsgáltam, hogyan változik a CRK7 génexpresszió mértéke egy belső kontroll génhez képest üvegházi és *in vitro* körülmények között nevelt *A. thaliana* (Col-0) növényekben.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. *Arabidopsis thaliana* (lúdfű)

2. 1. 1. Rövid története, szervezettani felépítése

Az *A. thaliana* napjainkban az egyik leggyakrabban alkalmazott modellorganizmus a növénybiológiai tanulmányokban. Először egy szász fizikus, Johannes Thal írta le *Pilosella siliquosa minor* néven még az 1500-as években. Zárvatermő, kétszikű, a keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjába tartozó, egy- vagy kétéves növény. Szárlevelei szórt állásúak, hosszú lándzsás levelei tölevélrózsát képeznek. Hosszúnappalos növény, reprodukív hajtásának kialakulását 14-16 órás megvilágítás segíti (Koncz és Rédei, 1999). A teljes életsiklus -beleértve a magok csírázását, a rozetta levél kialakulását, a fő virágzati tengely létrejöttét, a virágzást és az első magok érését- 6 hét alatt végbemegy. A kifejlett növény önmegtermékenyítő, kistermetű, mindössze 10-30 cm-es. A vad típus levelein és szárán háromágú trichómák (szőrök) találhatóak. A levélrozettából kinövő szétágazó szárok végein spirális körökben fejlődő virágok első öve 4 csészelevelet, második öve 4 szíromlevelet, harmadik öve 2 rövidebb és 4 hosszabb porzót, a negyedik öv két szimmetrikus részből összeforrt termőt tartalmaz. Utóbbiból hosszú, vékony, 5-20 mm-es becőtermés alakul ki, ami száraz állapotban felnyílik, és 20-30 magot produkál. Egyetlen kifejlett növény akár több száz becőt is létrehozhat, amiben több mint 5000 darab, egyenként 0,5 mm hosszúságú mag található (Meinke és mtsai, 1998). Mészkerülő gyomtársulásokban fellelhető Európában, Dél-Amerikában, de egyes ökotípusai (Columbia, Landsberg erecta) előfordulnak Kínában, Afrika egyes területein is (Koncz és Rédei, 1999).

2. 1. 2. *Arabidopsis* mint a növényi genetika modellorganizmusa

A lúdfű genom teljes szekvenciájának megismerésével (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) lehetőség nyílt részletesebben tanulmányozni a növényi gének különböző funkcióit. Az *Arabidopsis thaliana* genomja megközelítőleg 157 Mb (Bennett és mtsai, 2003). A lúdfű gaméta DNS-e 5 kromoszómát képez, azaz a diploid *A. thaliana* kromoszómaszáma 10. Az *A. thaliana* kisméretű genomja, a genomi DNS-ének alacsony metiláltsági foka, valamint a növény rövid generációs ideje és könnyű *in vitro* fenntarthatósága alkalmassá teszi ezt a fajt arra, hogy a magasabbrendű kétszikű növények számára modellorganizmusként szolgáljon. További előny, hogy az *A. thaliana* genom teljes genomi DNS szekvenciája ismert, ami számos mutáns gyűjtemény létrehozását és ebből

fakadóan magasszintű genetikai vizsgálatokat tesz lehetővé. Az egyes ökotípusok szakaszosan ismétlődő DNS-szekvenciái jelentős különbséget mutatnak, ami lehetővé teszi az ezen alapuló genetikai kapcsoltsági térképek elkészítését. A lúdfű közel 27000 génnel rendelkezik, ezek mintegy 35000 fehérjét kódolnak. A modellorganizmus nagy előnye, hogy az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette természetes génátvitellel nagyszámú, T-DNS inszerciót hordozó mutáns vonalat lehet előállítani.

2. 2. A Ca^{2+} ion mint másodlagos jelátviteli molekula

A kalciumion rendkívül fontos szignál komponense minden eukarióta organizmusnak. Növényekben különböző biotikus és abiotikus stimulusokra adott válaszreakcióban játszik szerepet, ide tartozik például a fény, magas és alacsony hőmérséklet, szárazság és ozmotikus stressz, növényi hormonok és patogén elicitorok. A kiváltó tényezők hatására térben és időben specifikus, jól megkülönböztető változás figyelhető meg a szabad citoszolikus kalcium koncentrációban (Hashimoto és Kudla, 2011).

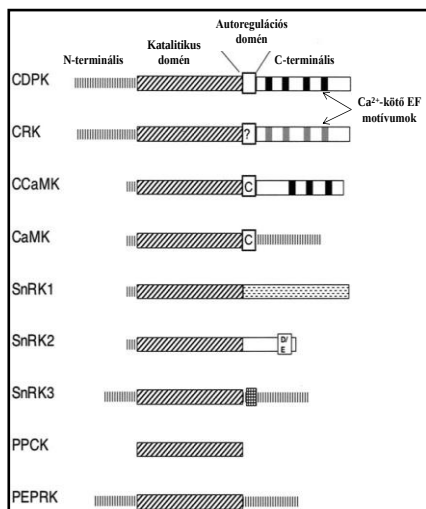
Növényekben a szabad citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció mindössze kb. 0,1-0,2 μM . Ez az alacsony Ca^{2+} koncentráció többek között a sejtfalakban történő megkötődés, a sejten belüli szervecskékben (kompartmentekben) való felhalmozódás és a Ca^{2+} -ATPázok működésének következménye. Külső ingerek hatására megemelkedik a plazmamembrán (PM) permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve és kalcium beáramlás (influx) történik, így a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció megemelkedik. Bizonyos másodlagos jelátviteli komponensek, mint például az IP_3 (inozitol-1,4,5- trifoszfát) képesek sejten belüli, Ca^{2+} -ot raktározó sejtsejtszervecskék (endoplazmatikus retikulum, vakuólum) membránjaiban található receptorokhoz kötődve további kalcium felszabadulást (efflux-ot) előidézni. Ennek eredménye végső soron a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció további emelkedése. A növényekben, például *Arabidopsis thaliana*-ban szép számmal fordulnak elő olyan Ca^{2+} által szabályozott fehérjék, amelyek képesek a kétértékű kation megkötésére (Fodor és Zsoldos, 1998).

2. 3. Az *Arabidopsis thaliana* CDPK-SnRK szupercsalád

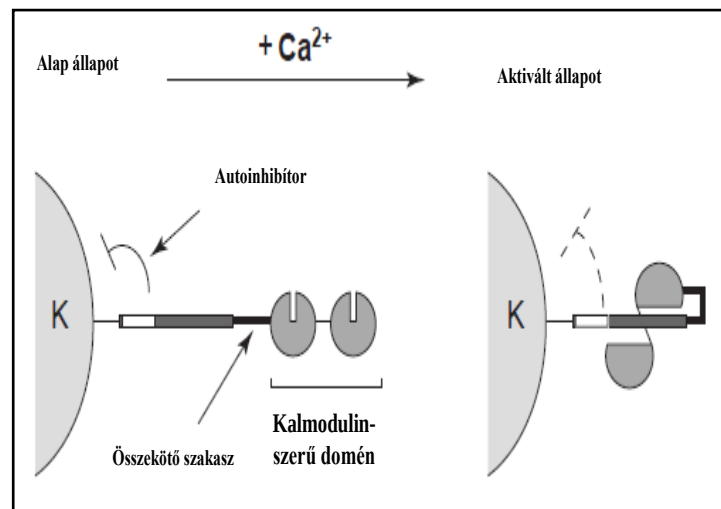
2. 3. 1. A szupercsalád általános jellemzése

A CDPK-SnRK szupercsalád felépítése a teljes *Arabidopsis thaliana* genom szekvencián alapul (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). A növényi és állati protein kinázok működésüket tekintve jelentősen eltérnek egymástól. A növényekben megtalálható receptor kinázok a szerin (Ser) és treonin (Thr) aminosav oldalláncokat foszforilálják, míg az állati szervezetekben találhatóak a tirozin (Tyr) oldalláncokat

A CDPK-SnRK szupercsaládba hét szerin-treonin protein kináz család tartozik: CDPK-k (kalcium-függő protein kinázok), CRK-k (CDPK-szerű protein kinázok), PPCK-k (foszfoenolpiruvát karboxiláz kinázok), PEPRK-k (PEP karboxiláz kináz-szerű kinázok), CaMK-k (kalmodulin-függő protein kinázok), CCaMK-k (kalcium és kalmodulin-függő protein kinázok) és az SnRK-k (SNF1- szerű kinázok). Lúdfüben összesen 34 CDPK-t, 8 CRK-t, 2 PEPCCK-t, 2 PEPRK-t és 38 SnRK-t azonosítottak. A kalcium-függő protein kinázok növényekben és a protozoák néhány alcsoportjában, míg a CRK-k, PEPCCK-k, PEPRK-k és két SnRK alcsoport csak növényekben fordul elő. A fentebb említett családok szerkezete alapvetően hasonló, de mégis előfordulnak jelentős eltérések. Mindegyik tartalmaz egy tipikusan eukarióta Ser-Thr protein kinázokra jellemző katalitikus domént. Az N-terminális domén mind hosszúságban, mind pedig szekvencia összetételben rendkívül variábilis az egyes alcsaládok között. Néhány CDPK N-terminális doménjén mirisztillációs, illetve palmitoilációs helyet feltételeznek a kutatók, aminek a plazmamembrán (PM) vagy egyéb más membrán lokalizációban lehet fontos szerepe (Hrabak és mtsai, 2003). A CDPK-SnRK szupercsaládot alkotó családok domén struktúrája az **1.a ábrán** látható:



1.a ábra (Hrabak és mtsai, 2003).



1.b ábra (Harmon és mtsai, 2000)

Az N- és C-terminális az egyes családok esetében különböző hosszúságú. A C-terminálison látható, fekete téglalapok a működőképes kalcium-kötő EF motívumokat szimbolizálják. A CRK-k esetében a Ca^{2+} -kötő motívumok módosultak, így az **1.a ábrán** szürke téglalappal vannak illusztrálva. A CaMK és a CCaMK esetében C-vel jelöli az ábra,

hogy az autoinhibitor (autoregulációs) domén átfed a kalmodulin-kötő doménnel. A PPCK-k esetében nincsen N- és C-terminális domén.

2. 3. 2. A CDPK család bemutatása

A kalcium-függő protein kinázok (CDPK-k) az egyik legjobban jellemzett növényi kináz család. Szerkezetükre jellemző az N-terminális variábilis domén, majd ezt követően egy katalitikus kináz és egy autoregulációs (autoinhibitor) domén, végül egy kalmodulin-szerű, 4 darab Ca^{2+} -kötő EF motívumot (hand) tartalmazó C-terminális alegység. Éppen a C-terminális sajátosságai miatt nevezik kalmodulin domén-szerű protein kinázoknak is. A kalcium a speciális EF mintázatokhoz kötődve képes szabályozni, illetve aktiválni a kinázt. A CDPK-k aktivációjának modelljét a **1.b ábra** szemlélteti. Alapállapotban nincsen jelen kalciumion, így az autoinhibitor gátolja az enzim aktivációját. Ca^{2+} hatására egy intramolekuláris átrendeződés megy végbe, konformáció változás történik, ennek eredményeként megszűnik az autoinhibitor kináz doménre gyakorolt gátló hatása és az enzim aktiválódik.

A CDPK fehérjék molekulatömege 54,3 kDa és 72,2 kDa közötti tartományban változik. A legtöbb kalcium-függő protein kináz (CDPK) az N-terminális részén tartalmaz mirisztilációs helyet, továbbá egy közeli cisztein (Cys) aminosav oldallánc palmitoilációs helyként funkcionálhat. Ezeknek szerepük lehet a plazmamembrán (PM) vagy más egyéb membrán lokalizációban. Több *Arabidopsis* CDPK-ról is kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között mirisztilálódik (Dammann és mtsai, 2003). A kalcium-függő protein kinázok a növényeken kívül-még néhány protozoában fordulnak elő, viszont egyáltalán nincsenek jelen például nematódában és élesztőben (Harmon és mtsai, 2000, Hrabak és mtsai, 2003).

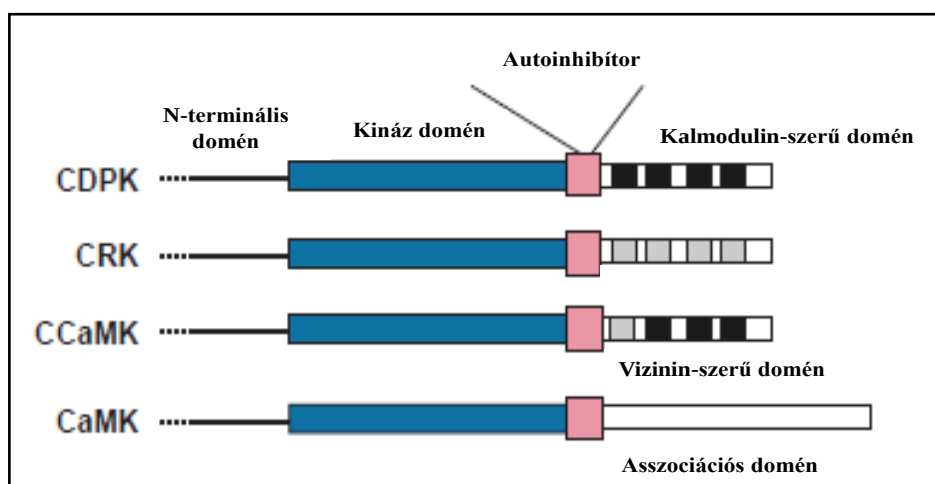
2. 3. 3. CaMK és CCaMK

A kalmodulin-függő protein kinázok (CaMK-k) nem találhatóak meg *Arabidopsis thaliana*-ban. A CaMK kinázokat az autoinhibitor doménhez kötődő kalmodulin aktiválja, ami a C-terminális és a kináz domén között található. Az enzimek eme nagy családja állatokban és élesztőben ismert, de növények közül eddig csak almában találtak egy homológ enzimet. A fehérje szekvencia összehasonlítás alapján kiderült, hogy az almából származó kináz a rokonsági kapcsolatot figyelembe véve tulajdonképpen a Ca^{2+} és kalmodulin-függő protein kinázokhoz (CCaMK-hoz) áll a legközelebb.

A CCaMK protein kinázok hasonlóan a CaMK csoporthoz nincsenek jelen lúdfűben. A funkcionális alegységek felépítése megegyezik a CDPK-nál leírtakkal, de a kalcium-kötő

domén szerkezete nem kalmodulin (CaM), hanem inkább vizinin-szerű. A C-terminális domén a CDPK-val ellentétben nem négy, csak három Ca^{2+} -kötő EF hand-et (motívumot) tartalmaz. A CCaMK kinázok rendelkeznek kalmodulin-kötő hellyel, amely átfed az autoregulátor doménnel.

A CCaMK fehérjék Ca^{2+} és CaM általi szabályozása összetett. A kalcium a vizinin-szerű domén EF motívumaihoz kötődve fokozza az autofoszforylációt. Ennek eredményeként az enzim valószínűleg nagyobb affinitással köti meg a Ca^{2+} /kalmodulin komplexet, így serkentve a szubsztrát-foszforylációt is (Hrabak és mtsai, 2003). A CaMK, CCaMK család domén szerkezetének bemutatása a **2. ábrán** látható. A C-terminális doméneken található funkcionális EF motívumok fekete, míg a módosult kalcium-kötő helyek szürke négyzettel vannak jelölve.



2. ábra: A CDPK, CRK, CCaMK és CaMK családok domén szerveződésének bemutatása (Harmon és mtsai, 2000).

2. 3. 4. CRK család

A CDPK-szerű protein kinázok (CRK-k) kizárólag növényekben fordulnak elő. *Arabidopsis thaliana*-ban 8 feltételezett izoenzimet azonosítottak. A CRK protein kinázokat eddig még nem igazán tanulmányozták. Szerkezetüket jól szemlélteti az **1.a** és **2. ábra**. Mint korábban már említettem, a CRK-k C-terminális alegységén található kalcium-kötő EF motívumok módosultak, így valószínűleg nem képesek megkötni a Ca^{2+} -ot. A következő táblázat a lúdfüben azonosított 8 CRK protein kinázt hasonlítja össze néhány szempont alapján:

Gén neve	Szinonima	Intronok száma	Molekulatömeg (kDa)	Mirisztifikációs motívum
<i>CRK1</i>	At2g41140	10	64,3	+
<i>CRK2</i>	At3g19100	9	67,2	+
<i>CRK3</i>	At2g46700	10	66,6	+
<i>CRK4</i>	At5g24430	10	66,5	+
<i>CRK5</i>	At3g50530	10	67,0	+
<i>CRK6</i>	At3g49370	10	66,4	+
<i>CRK7</i>	At3g56760	10	64,6	+
<i>CRK8</i>	At1g49580	10	68,0	+

1. táblázat: *Arabidopsis thaliana* CRK izoenzimiek összehasonlítása (Forrás: <http://plantsp.genomics.purdue.edu>).

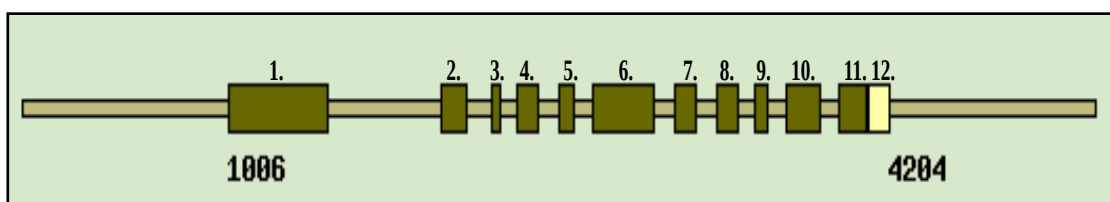
A táblázatból kiderül, hogy a *CRK2* génben egy intronnal kevesebb található, mint a többi génben.

Jelenleg nagyon kevés információ áll rendelkezésre a CRK-k aktivációjának mechanizmusáról, lehetséges szubsztrátjaikról, lokalizációjukról. Korábbi kutatásokban vizsgálták már az *Arabidopsis thaliana* CRK1-et (AtCRK1, Wang és mtsai, 2004) és a CRK3-at (AtCRK3, Du és mtsai, 2005) is. Répából (DcCRK, Farmer és Choi, 1999) és kukoricából (ZmCRK, Furumoto és mtsai, 1996) származó rekombináns kinázokon végrehajtott biokémiai tanulmányokból kiderül, hogy nem befolyásolja az aktivitásukat a kalcium jelenléte. A ZmCRK-n (*Zea mays* CRK) elvégzett kísérletek alapján arra következtetnek a kutatók, hogy a CRK protein kinázokban nincsen működőképes autoinhibitor domén, ugyanis a kukoricából származó ZmCRK egyaránt aktív volt Ca^{2+} vagy EGTA jelenlétében is. Rizsből származó CRK (OsCRK, Zhang és mtsai, 2002) kalcium-függő módon kalmodulint köt, viszont az enzim aktivitása független a kalciumtól és a CaM-tól. Ebből következik, hogy a CRK-k valószínűleg konstitutívan aktívak (Furumoto és mtsai, 1996; Hrabak és mtsai, 2003). AtCRK1 esetében megállapították, hogy képes kalcium-függő módon kalmodulint kötni (hasonlóan az OsCRK-hoz), de az enzim aktivitása független a kalciumtól, viszont fokozható többféle CaM izoformával. A különböző kalmodulin formák által kiváltott aktivitás fokozódás mértéke minden esetben hasonló eredményt mutatott. (Wang és mtsai, 2004). *Arabidopsis* CRK3 (AtCRK3) esetén szintén megállapították az enzimaktivitás kalcium függetlenségét, továbbá a kináz *in vitro* reakcióban képes foszforilálni egy lehetséges citoszolikus fehérjét, az AtGLN1,1-et (A.

thaliana glutamin szintetáz 1.1), aminek szerepe van a levelek öregedési folyamataiban (Li és mtsai, 2006).

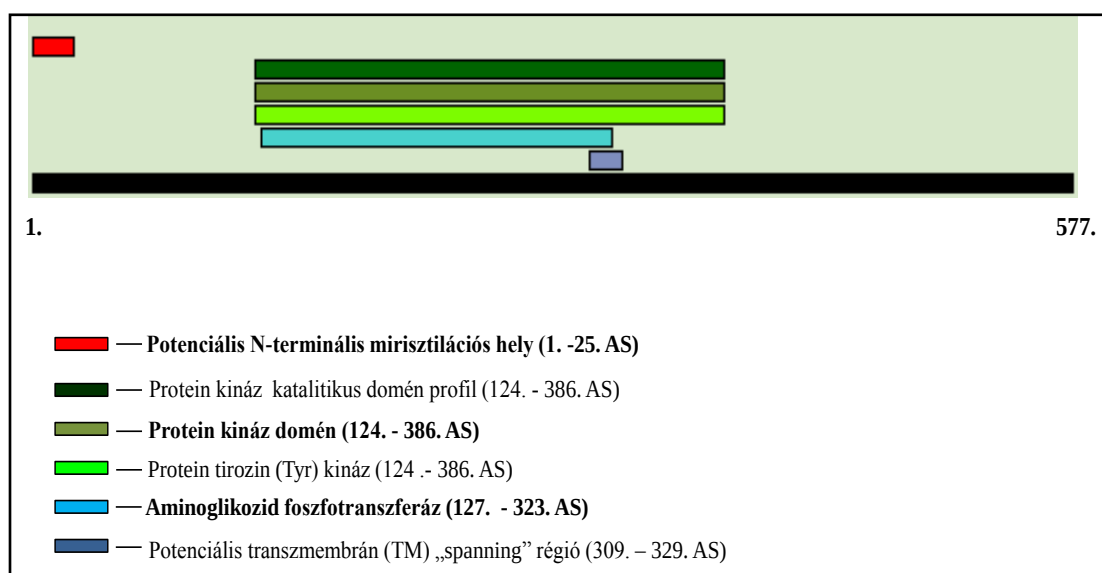
2. 4. A CRK7 felépítése, jellemzése

A CRK7 egy 64,6 kDa-os, 577 aminosavból (AS) felépülő fehérje, amit az *Arabidopsis thaliana* harmadik kromoszómáján található At3g56760-as gén kódol. A protein kináz alapvető felépítése megegyezik a 2. 3. 1. részben leírtakkal, valamint az 1. és 2. ábra is szemlélteti. A 3. ábrán a CRK7-es gén szerkezete látható:



3. ábra: A CRK7-es gén szerkezete (Forrás: <http://plantsp.genomics.purdue.edu>).

A teljes gén 5202 bázispár (bp), míg az mRNS (illetve cDNS) 1734 bp hosszúságú. A 3. ábrán látható számok a génben található exonokat (1-11.) és az UTR-t jelölik (12.). Az első exon az 1006. bp-nál kezdődik és az 1491. bp-ig tart. Az utolsó exon a 3964. bp-tól indul és a 4101. bp-nál ér véget. Az 4. ábra szemlélteti a CRK7 protein kináz felépítését:



4. ábra: A CRK7 protein kináz aminosav szekvenciája (1-577. aminosav) (Forrás: <http://plantsp.genomics.purdue.edu>).

3. Célkitűzések

Elsődleges célom volt, hogy a teljes hosszúságú CRK7 cDNS szakaszt indukálható pET-28a (+) vektorba klónozzam, ennek segítségével His₆ jelöléssel lássam el a CRK7 fehérjét, ami lehetővé teszi a kináz affinitáskromatográfián alapuló tisztítását túltermelő *E. coli* kultúrából. A baktériumból tisztított fehérjével kináz-aktivitás vizsgálatot terveztem, annak kiderítésére, hogyan befolyásolja a kináz aktivitását a Ca²⁺ és az EGTA jelenléte, valamint képes-e foszforilálni a mesterséges szubsztrátként felkínált mielin bázikus fehérjét (MBP).

Célom volt a cDNS stop kodonját PCR-alapú módosítással eltávolítani, majd egy úgynevezett „entry klón”-t létrehozni. Ezt követően Gateway technológiát alkalmazva, LR klonáz reakció segítségével kanamicin rezisztenciagént tartalmazó bináris vektorba klónozni, hogy a CRK7 cDNS-t egy fluoreszcens módszerrel detektálható fúziós GFP (Green Fluorescence Protein) riportergénnel lássam el. További feladatomból volt, hogy a létrehozott 35S::CRK7-GFP konstrukciót *Agrobacterium* közvetített transzformációval bejuttassam *A. thaliana* (Col-0) növénybe és *A. thaliana* (Col-0) sejtszuszpenzióba, és utána lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM) és differenciális centrifugálást követő Western analízis segítségével meghatározzam a CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációját a szelektált elsődleges transzformált (T1-es) növényekben és sejtszuszpenzióban.

További célkitűzésem volt üvegházi és *in vitro* körülmények között nevelt növényekből, illetve növényi részekből RNS-t izolálni, real-time PCR (QRT) módszerrel vizsgálni a CRK7-es gén kifejeződését (egy belső kontroll génhez viszonyítva).

Végül a laboratórium által korábban megrendelt, T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns növényi vonal (SALK Institute, USA) segítségével szerettem volna megismerni a CRK7-es gén lehetséges funkcióit.

4. Anyagok és módszerek

4. 1. Vegyszerek, műszerek, enzimek és egyéb készítmények

Kísérleteim során az alábbi gyártóktól származó termékeket használtam:

Reanal, Fluka, BD (Becton, Dickinson), Eppendorf, Duchefa Biochemie, ACCU Gene Merck, Lonza, Molar, AppliedBiosystems, Sigma-Aldrich, Biosan, Invitrogen, Heraeus, GFL, Bio-Rad, Stratagene, Whatmann, Amersham, Greiner, Kodak, Roche, Millipore, Sorvall, Lasergene, Izotóp Intézet Kft., Fermentas, Uvikon, Olympus, Biocenter Kft., QIAGEN, Pierce, MultiTarget Pharmaceuticals', ThermoFisher Scientific Inc., RETSCH,

4. 2. Módszerek

4. 2. 1. Bakteriális technikák

4. 2. 1. 1. Kompetens sejt transzformálása

E.coli esetében ún. „heat shock” (hő sokk) transzformációt alkalmaztam *Sambrook és mtsai*, (1989) leírását követve. Plazmid szaporításhoz a DH5α [F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoRnupG Φ 80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17 (rK-mK+), λ^-] (*Hanahan 1985*) törzset, fehérje túltermeltetéshez a BL21 (DE3) Rosetta [F^- ompThsdSB(rB- mB-) galcdm lacY1(DE3) pRARE6 (CmR)] (Novagen) törzset használtam.

4. 2. 1. 2. Baktériumok szaporítása

Szilárd táptalajon növesztett, egyedi baktérium telepet steril pipettahegy segítségével folyékony médiumban inokuláltam és a növekedéshez szükséges optimális hőmérsékleten 250-300 fordulat/perc (rpm) sebességgel 24 órán keresztül rázattam. *E. coli*-t 37 °C-on LB tápoldatban, (*Sambrook és mtsai*, 1989), míg *Agrobacterium*-ot 28 °C-on YEB médiumban (*Koncz és mtsai*, 1994) növesztettem a megfelelő antibiotikumok jelenlétében.

4. 2. 1. 3. *Agrobacterium* háromszülős konjugációja („triparentális mating”, *Cindy és mtsai*, 1994)

A bináris vektort tartalmazó donor *E. coli* törzset és az ún. „helper” törzset HB101-pRK2013 (*Ditta és mtsai*, 1980) 24 órán át 37 °C-on növesztettem LB médiumon, a megfelelő antibiotikumok jelenlétében. A recipiens *Agrobacterium* törzset GV3101-pMP90 (*Koncz és Schell*, 1986) 1 napon keresztül 28 °C-on növesztettem YEB médiumon. A donor, helper és recipiens baktérium törzsekből egy kis mennyiséget összekevertem, LB táptalajra kicseppentettem, majd beszáradás után 28 °C-on inkubáltam egy éjszakán át.

Másnap kis mennyiséget szélesztettem megfelelő antibiotikumokat tartalmazó YEB médiumra a bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium* szelektálása céljából. A lemezeket 28 °C-on tároltam a telepek megjelenéséig, majd a szélesztést még egyszer megismételtem.

4. 2. 2. Növényi anyagon alkalmazott technikák

4. 2. 2. 1. *Arabidopsis thaliana* magvak felületi sterilizése, kirakása táptalajra

A magokat 1,5 ml-es eppendorf csőben fertőtlenítettem. Első lépésként 70%-os etanolban 1 percig, utána 4%-os hypo-ban (Domestos) 15 percig rázattam. A magokat ötször mostam 1 ml Milli-Q (MQ) vízzel, hogy eltávolítsam róluk a maradék fertőtlenítőszert. A sterilizett magokat, ha szükséges volt, megfelelő antibiotikumokat tartalmazó ½ (MS)AR médiumra (2,2 g/l MS salt, Duchefa Biochimie-Kat. szám: M0231, 5 g/l szacharóz, pH= 5,7-5,8; agar 8 g/l) egy éjszakányi 4 °C-on történő inkubáció után raktam ki. A kicsírázott növényeket termosztát szobában (8h/16h órás fény/sötét periódus), illetve a kiültetést követően üvegházban 23 °C-on 16 órás megvilágítás alatt neveltem.

4. 2. 2. 2. *Arabidopsis* sejtszuszpenzió *Agrobacterium*-mal történő transzformációja

Az *Agrobacterium*-ot a sejtszuszpenzió transzformálását megelőző napon oltottam le 20 ml folyékony YEB médiumba, amely tartalmazott 2mM MgSO₄-ot, 25 mg/l gentamicin-t és 100 mg/l spectinomycin-t. A baktériumot 150-200 fordulat/perc (rpm) sebességgel 24 órán keresztül 28 °C-on rázattam. Másnap az *Agrobacterium*-ot 50 ml-es falcon csőbe töltöttem és 3000 rpm-mel centrifugáltam 20 percig. A leülepedett sejteket 3-5 ml növényi sejtszuszpenziós médiumban (4,4 g/l MS készítmény, Duchefa Biochimie-Kat. szám: M0231, 30 g/l szacharóz, pH= 5,7-5, 0,24 mg/l 2,4D, 0,014 mg/l kinetin) szuszpendáltam fel. Steril 100 ml-es lombikba passzáltam az *A. thaliana* (Col-0) szuszpenzióból (23 ml friss médium és 2,5 ml 1 hetes sejt kultúra), majd hozzáadtam 600 µl-t a fent említett *Agrobacterium* oldatból. Összerázást követően a szuszpenziót 1 órát állni hagytam 23 °C-on (növénynevelő szoba), utána 48 órán keresztül rázón 100-120 rpm sebességgel rázatva inkubáltam, majd a lombik tartalmát falcon csőbe töltöttem és alacsony sebességgel (1000 rpm) centrifugáltam. A leülepedett sejteket friss médium hozzáadásával, valamint óvatos rázással felsuszpendáltam és steril 100 ml-es lombikba töltöttem. Ezt követően claforan-t (200 mg/l) és carbenicillin-t (200 mg/l) tettem a sejt kultúrához, hogy az *Agrobacterium*-ot elpusztítsam. Az ötödik nap elteltével 100 mg/l kanamicint adtam a kultúrához a transzformáns sejtek szelektálása céljából. A rázógépről levett 5 ml leülepedett sejtet átpipettáztam egy steril 250 ml-es lombikba, majd 45 ml friss médiumot, valamint a megfelelő mennyiségű antibiotikumokat adtam hozzá. Hetenként megismételtem a

passzálást a fent leírtak szerint, amíg stabil, kanamicin rezisztens, *Agrobacterium*-tól mentes szuszpenziót nem kaptam.

4. 2. 2. 3. *Arabidopsis thaliana* virágzat infiltrációs transzformálása (Clough és mtsai, 1998)

A kísérlethez termosztát szobában ½(MS)AR-en csíráztatott, majd üvegházban nevelt 5-6 hetes *A. thaliana* (Col-0) virágzó növényeket használtam. Az *Agrobacterium*-ot a transzformációt megelőző napon oltattam le a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó YEB médiumban és 28 °C-on rázattam. A baktériumot 20 percig 6000 rpm-mel centrifugáltam 20 °C-on. A leülepedett sejteket infiltrációs médiumban (5% szacharóz, 0,01% Silwet L77) szuszpendáltam fel úgy, hogy az OD_{600nm} értéke 0.8-1 legyen. A növények virágzatát az *Agrobacterium*-ot tartalmazó infiltrációs oldatba merítettem 2-3 percig, majd 24 órán keresztül lefedve tároltam. Ezt a kezelést egy hét elteltével megismételtem. Az érett magok felületét sterilizáltam és utána szelektív táptalajon csíráztattam.

4. 2. 2. 4. Lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM)

A CRK7 protein kináz térbeli expressziós mintázatának vizsgálatához a *CRK7-GFP* riportergén konstrukciót használtam. ½ (MS)AR táptalajon 25 mg/l kanamicin, 200 mg/l claforan jelenlétében szelektáltam a pK7FWG2.0-CRK7-EcoRV No Stop konstrukcióval infiltrált Col-0 magokat a 4. 2. 2. 1. leírtak szerint. A kanamicin rezisztens növényeket a hetedik napon mikroszkóp fedőlemezen 1 csepp vízbe tettem, majd egy újabb fedőlemezzel lefedtem. A vizsgálatához Olympus FV1000 lézer szkennning mikroszkópot használtam (Mikroszkópos Sejtanalízis Labor, SZBK, Szeged, Mo.) a következő konfigurációval: 20x objektív lencse (UPLSAPO 20x), GFP gerjesztési hullámhossz: 488 nm, GFP emissziós hullámhossz: 550 nm, szekvenciális szkennelési mód, lézer transzmisszió 10%. A képeket Olympus Fluoview FW1000 program segítségével készítettem el.

4. 2. 3. Molekuláris biológia módszerek

4. 2. 3. 1. Plazmid DNS tisztítása baktérium sejtből

Sambrook és mtsai, (1989) útmutatásait követve plazmid DNS-t izoláltam 3 ml *E. coli* kultúrából, amit a folyamat végén 70 µl RNáz tartalmú TE (10mM Tris-HCl pH= 8.0; 1mM EDTA pH= 8.0) oldatban szuszpendáltam fel. A plazmid preparátumot -20°C-on tároltam felhasználásig.

4. 2. 3. 2. Plazmid DNS restrikciós emésztése

Az emésztés során 5 µg plazmid DNS-t használtam fel. Az emésztési reakciókat 2,5-5 U enzimmal végeztem, a restrikciós endonukleáz számára megfelelő pufferben, a gyártó cég útmutatásait követve 1,5-2 órán keresztül. A reakció után 0,8%-os 0,5XTBE agaróz gélen ellenőriztem az emésztés eredményét (*Sambrook és mtsai, 1989*), DNS referencia marker (GeneRuler 1kb-s DNS molekulalétra, Fermentas, SM0311) segítségével.

4. 2. 3. 3. DNS fragment tisztítása agaróz gélből

A restrikciós emésztést követően a mintát 0,8%-os agaróz gélen ellenőriztem, ahol a DNS darabok (fragmentek) tisztán elkülönülnek egymástól. A továbbiakban használni kívánt fragmentet kivágtam a gélből és steril eppendorf csőbe helyeztem. A tisztítást gél extrakciós termék EZ-10 Spin Column DNS Gel Extraction kit segítségével végeztem el a kitben foglaltak szerint. A tisztított DNS-ből néhány µl-t elektroforézissel agaróz gélen ellenőriztem, koncentrációját NanoDrop (ThermoFisher Scientific Inc.) készülékkel mértem le. A DNS-t tovább használtam restrikciós emésztéseknél és ligálási reakcióknál.

4. 2. 3. 4. Tisztított DNS fragmentek ligálása

A ligálás során 20-50 ng DNS-t használtam fel, a fragment mennyisége háromszor annyi volt, mint a vektoré. A reakciók alkalmával T4 DNS ligáz enzimet (Fermentas) használtam, a gyártó ajánlását követve.

4. 2. 3. 5. LR Klonáz reakció

A gyártó útmutatásait követve, LR Clonase (Invitrogen) enzim mixet használva restrikciós emésztés-ligálás nélkül lehetséges a kívánt DNS szakaszt mozgatni, ha az speciális határoló szekvenciát tartalmaz.

4. 2. 3. 6. Növényi teljes RNS tisztítás

Az üvegházi, illetve *in vitro* körülmények között nevelt növényi mintákat (kb. 50-100 mg) folyékony nitrogénben lefagyasztottam 1,5 ml Eppendorf csőben egy 3 mm-es csapágygolyóval együtt, majd rázógép (RETSCH MM301) segítségével feltártam a mintákat. A törmelékhez TRI reagenst (Sigma-Aldrich) adtam, majd követtem a gyártó által leírt lépéseket. A megszáritott RNS csapadékot 100 µl nagy tisztaságú RNáz-mentes vízben (ACCU Gene) oldottam fel. Az RNS minőségét gélelektroforézissel ellenőriztem (*Sambrook és mtsai, 1989*), koncentrációját NanoDrop (ThermoFisher Scientific Inc.) készülékkel mértem le.

4. 2. 3. 7. Növényi teljes DNS tisztítás

Az üvegházi növényekből származó minta begyűjtése és kezelése megegyezett az RNS izolálásnál leírtakkal, azonban ebben az esetben az AquaGenomic (MultiTarget Pharmaceuticals') DNS izoláló oldatot használtam. A megszárított DNS csapadékot 50 µl TE oldatban oldottam fel, felhasználásig -20°C-on tároltam.

4. 2. 4. PCR technikák

4. 2. 4. 1. Kolónia PCR

A kolónia PCR technika segítségével el lehet dönteni azt, hogy a plazmid tartalmazza-e a beklónozott DNS fragmentet vagy sem. A reakció során DNS templátként az egyedi baktériumtelepeket használtam, belemosva egy kis mennyiséget az előkészített PCR keverékbe. A folyamathoz 1 U DreamTaq enzimet (Fermentas), és megfelelő primereket használtam.

4. 2. 4. 2. Real-Time PCR

A reverz-transzkripció-kapcsolt PCR során a növényi szövetekből izolált teljes RNS-ből cDNS írtam. Ehhez egy speciális átíró készítményt High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems) alkalmaztam, a kitben leírtak szerint eljárva. Az átírt cDNS-t PCR reakcióval ellenőriztem.

A valós idejű PCR reakcióhoz SYBR-Green Jump Start Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich) festéket, 6 µl cDNS-t, *CRK7* (forward: TTCAGGCTTTCCGTTTTATAGTCC; reverz: GAGCTCACGCTGGAGGATG) és *ACT* (belső kontroll gén) (forward: GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG; reverz: AACGACCTTAATCTTCATGCTGC) primereket használtam fel. A 40 ciklusból álló reakció 7900 HT Fast Real-Time PCR készülékben, az alábbi körülmények között ment végbe: 95 °C 10 perc; 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc; disszociáció: 95 °C 15 másodperc, 60 °C 15 másodperc, 95 °C 15 másodperc. Az eredmények kiértékeléséhez ABI SDS 2.3 és RQ Manager 1.2 programokat használtam.

4. 2. 5. Összetett molekuláris biológiai módszerek

4. 2. 5. 1. CRK7 protein kináz tisztítása baktériumból

A teljes hosszúságú *CRK7* cDNS-t tartalmazó pET-28a (+) (Novagen) konstrukciót BL21 (DE3) Rosetta kompetens sejtbe transzformáltam a korábban leírt módon. A baktériumot LB médiumra (25 mg/l kanamicin, 34 mg/l chloramphenicol, 0,4% glükóz) szélesztettem és 37 °C-on növesztettem egy éjszakán keresztül. A felnőtt telepekből néhányat 250 ml-es lombikban levő folyékony LB tápoldatba (antibiotikumok, glükóz)

oltottam, majd egész éjszaka 37 °C-on rázattam 200-250 fordulat/perc sebességgel. A baktérium kultúrát 1:10 arányban (100 ml friss médium, 10 ml baktérium kultúra) kihígítottam egy steril 250 ml-es lombikban, majd OD_{600nm} = 0,7-08-ig növesztettem 37 °C-on. Az OD ellenőrzést követően 1 ml-t kivettem, ami a nem indukált mintám volt, 13000 rpm-mel centrifugáltam és a pelletet használtam fel.

A maradék baktérium kultúrát 1mM-os IPTG-vel (Duchefa) 4-5 órát indukáltam (folyamatos rázás közben) szobahőmérsékleten. Az indukció lejárta után 1 ml mintát kivettem a kultúrából, centrifugáltam és a pelletet használtam tovább. A maradék baktériumot 15 percig 3500 rpm-mel centrifugáltam. A leülepedett pelletet 5 ml, lizozimet tartalmazó Lizis pufferben (50mM NaP (pH= 8,0), 10mM Tris-HCl (pH= 8,0), 300mM NaCl, 10mM Imidazol (pH= 8,07), 10% Glicerín, 2mM β-merkaptotanol) oldottam fel és 10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A felfuszpendált mintához 0,5%-os Triton X-100-at, 1mM-os MgSO₄-ot, DNáz-t és RNáz-t adtam, majd miután a minta viszkozitása lecsökkent, kb. 2-3 perc, 7000 fordulat/perc sebességgel 8 °C-on centrifugáltam 20 percig. Ez idő alatt elkészítettem a mátrixot, amin tisztítottam a fehérjét. Erre a célra 500 μl Ni-NTA (Invitrogen) agaróz mátrixot használtam.

A His₆ szekvenciát hordozó fehérjék hozzákötődnek az oszlopon immobilizált Ni²⁺ kationokhoz, így könnyen elválaszthatók a többi fehérjétől. A centrifugálás után a felülúszóból 50 μl-t kivettem, ez volt az ún. szolubilis (oldódó) frakció és a pelletet mint inszolubilis (nem oldódó) frakciót használtam. A maradék felülúszóhoz hozzápipettáztam a mátrixot, majd 15 ml-es Falcon csőben 30-40 percig 4 °C-on kevertettem, majd a mátrixot alacsony sebességű centrifugálással összegyűjtöttem. 1 ml felülúszót kivettem, ez volt az ún. átfolyó mintám. A mátrixot hatszor mostam mosó pufferrel, az alábbiak szerint: 2X5ml Mosó puffer I. (Lízis puffer, 0,5% Triton X-100), 2X5ml Mosó puffer II. (Lízis puffer, 20mM Imidazol, 0,5% Triton X-100), 2X5ml Mosó puffer III. (Lízis puffer, 20mM Imidazol, 0,1% Triton X-100). A mosások után centrifugálással gyűjtöttem össze a mátrixot, amit az utolsó tisztítás után kromatográfiás oszlopra pipettáztam. A megkötődött fehérjéket Elúciós puffer (Lízis puffer, 80mM Imidazol, 0,1% Triton X-100) segítségével oldottam le a mátrixról. A tisztítás során gyűjtött mintákat 8%-os poliakrilamid gélen ellenőriztem. A géleket Coomassie-val (*Sambrook és mtsai, 1989*) festettem meg. A tisztított His₆-CRK7 fehérjét *Sambrook és mtsai (1989)* szerint dializáltam 2 liter (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH= 7,5), 10% Glicerín 5mM β-merkaptotanol) oldatban és -80 °C-on tároltam, felhasználásig.

4. 2. 5. 2. Western-blot analízis

A minták teljes fehérjetartalmát Bio-Rad fehérjemeghatározó készlettel (*Bradford, 1976*) határoztam meg. 25-50 µg fehérjét denaturáló SDS-poliakrilamid gélen a méretük szerint elválasztottam (*Laemmli, 1970*), molekulasúly markerként PageRuler™ Prestained Protein Ladder-t (Fermentas SM0671) használva.

A gélből a fehérjéket Immobilon-P PVDF (Millipore) membránra juttattam át *Sambrook és mtsai (1989)* szerint. A reakció után a filteren rövid idejű desztillált vizes öblítését követően Ponceau-festést alkalmaztam, hogy megbizonyosodjak a fehérje transzfer sikerességéről. 1% ecetsav hozzáadását követően láthatóvá váltak a fehérje sávok. 1X TBS-T (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH= 8,0 +0,05% Tween-20)-sel mostam a membránt, hogy a festés teljesen eltűnjön. 1 órán keresztül tejporos oldattal blokkoltam a membránt (1X TBS-T+5% tejpor), majd 5 percig 1X TBS-T-vel mostam a filtert. Az elsődleges ellenanyaggal 1,5 óráig inkubáltam, majd háromszor 10 percig mostam a membránt 1X TBS-T-vel. A peroxidáz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal szintén 1,5 órát inkubáltam a filtert és utána háromszor mostam 1X TBS-T-vel, majd a detekcióhoz Immobilon Western Substrate-ot (Millipore) használtam a gyártó leírását követve.

4. 2. 5. 3. Radioaktív kináz aktivitás vizsgálat („kináz assay”)

A kísérlet fokozott figyelmet igényelt a radioaktív komponens miatt, ezért a feladat kivitelezését Rigó Gábor felügyelete alatt hajtottam végre. A módszer információt szolgáltat a kináz aktivitásáról, a kísérlet eredményéből meggyőződhetünk arról, hogy a kináz rendelkezik-e autofoszforylációval, illetve szubsztrát foszforylációval. Ezen kívül a kérdés még az volt, hogy különböző anyagok-molekulák hogyan befolyásolják a kináz aktivitását kísérleti elrendezéstől függően.

A reakciót a korábban kitisztított fehérjével végeztem kináz pufferben (20mM Tris-HCl pH= 8,0, 5mM MgCl₂, 1mM ditiotritol), 5 µCi (γ-32P) radioaktív ATP jelenlétében. A reakció 1 órán át szobahőmérsékleten zajlott, 20 µl végtérfogatban, 1 µg MBP (Mielin Bázikus Fehérje), 1mM EGTA vagy 0,1mM CaCl₂ jelenlétében, ahogy a reakció elrendezése megkívánta. A fehérje mintákat a 12%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélen elválasztottam, majd Coomassie-val festettem meg. A festés után a gélét ólomkazettába helyeztem, majd sötét szobában röntgen filmet tettem bele. A filmet 24-48 órán keresztül a kazettában tartottam és másnap a megfelelő oldatok segítségével előhívtam.

4. 2. 5. 4. Differenciális centrifugálás

A 35S::CRK7-GFP konstrukciót tartalmazó 25 mg/l kanamicinen szelektált transzformáns T1-es növényeket használtam fel a kísérletben. 5 g friss növényi anyagot 10 ml feltáró oldat (50mM Tris-HCl (pH= 7,5), 1mM EDTA (pH= 8,0), 350mM szacharóz, 1-2mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid), 1XPIC (Proteáz Inhibitor Koktél-Sigma P9599), 10 µl/1 ml, 1mM ditiotritol hozzáadásával 4 °C-on, jégen hűtött dörzsmozsárban homogenizáltam. Az oldatot leszűrtem Miracloth-on (Calbiochem), majd 1000xg sebességgel centrifugáltam 5 percig. A felülúszóból kivett 200 µl-t és a feltáró oldatban feloldott pelletet jégen tároltam felhasználásig. A maradék felülúszót átpipettáztam újabb centrifugacsőbe és 5000xg-vel centrifugáltam 10 percig. A mintavétel módja megegyezett a fentebb leírttal. Még két alkalommal centrifugáltam, 15000xg-vel 15 percig és 48000xg-vel 1 órán keresztül. Fent leírt módon meghatároztam a minták fehérjetartalmát, majd 50-50 µg proteint denaturáló SDS-poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottam (*Laemmli*, 1970), aztán Western blot segítségével, elsődleges ellenanyagként anti-GFP-t alkalmazva azonosítottam a CRK7-GFP fúziós fehérjét.

4. 2. 6. Bioinformatikai alkalmazások

A munkám során a következő alkalmazásokat használtam: 1., szekvencia elemzésre a Lasergene és Vector NTI demo programcsomagokat, valamint internetes honlapokat, a 2., DNS és fehérjeszekvencia vizsgálatokhoz, irodalomgyűjtéshez: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>), PlantsP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/>) internetes oldalakat vettem igénybe.

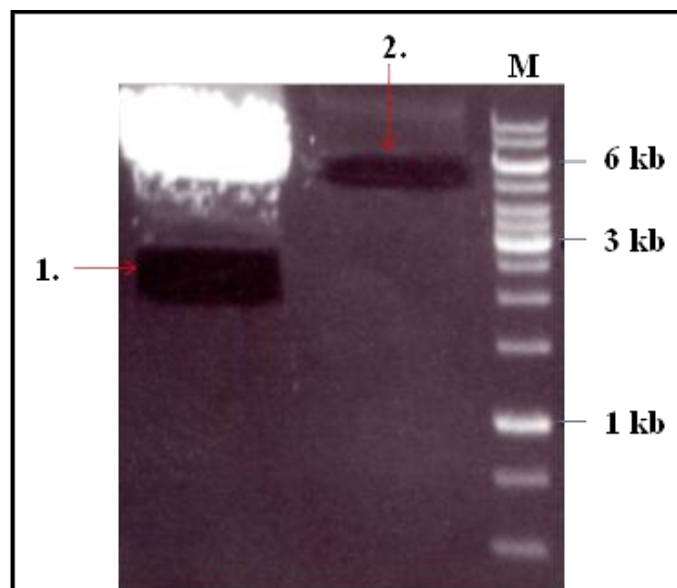
5. Eredmények és következtetések

5. 1. A CRK7 fehérje túltermeltetése bakteriális expressziós rendszerben

5. 1. 1. A CRK7 cDNS klónozása prokarióta expressziós vektorba

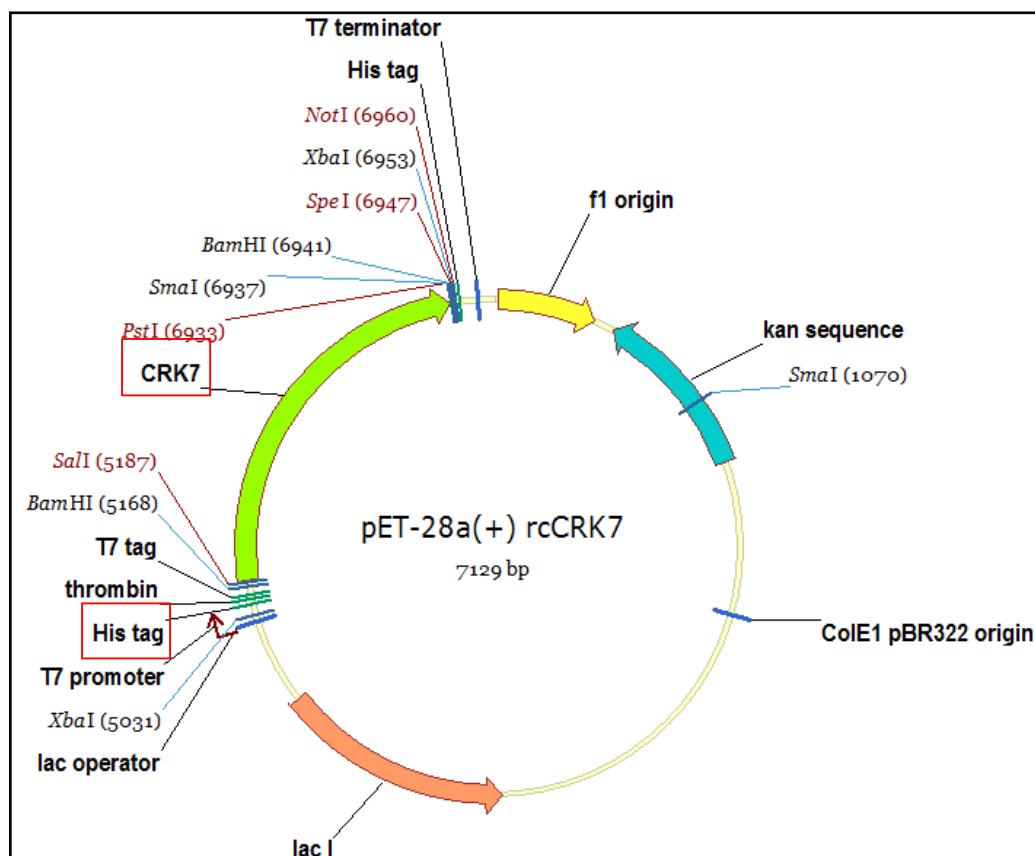
A kísérlethez donor vektorként a pBSKII (+)-CRK7 (C8/1) konstrukciót használtam, mely tartalmazta a teljes hosszúságú CRK7 cDNS-t. Kompetens sejtbe DH5 α F⁻ (Hanahan, 1985) történő transzformációt követően a baktériumot 100 mg/l carbenicillin-t tartalmazó LB médiumra szélesztettem, majd 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. Az egyedi telepekből és a pET-28a (+) vektort tartalmazó baktériumból plazmid DNS-t tisztítottam. A pET-28a (+) és a pBSKII-CRK7 (C8/1) konstrukciót Sal I és Not I restrikciós enzimekkel 1,5 órán át emésztettem, majd a kapott fragmenteket 0,8%-os agaróz gélből tisztítottam.

Az emésztés és az azt követő fragment izolálás eredményét az alábbi ábra mutatja be:



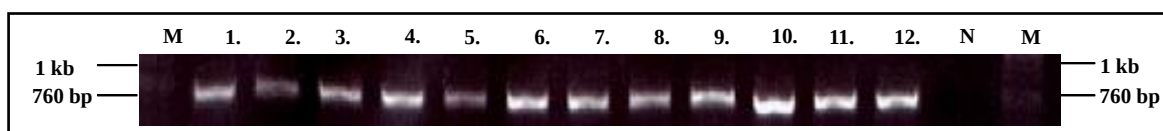
5. ábra: CRK7 és pET-28a (+) DNS fragmentek kivágása agaróz gélből. A képen számozva láthatóak: CRK7 (1.) és pET-28a (+) (2.), M: 1kb GeneRuler, (Fermentas).

Fragment izolálás után, T4 DNS ligáz segítségével létrehoztam a His₆-CRK7 fúziós konstrukciót (6. ábra).



6. ábra: pET-28a (+)-CRK7 konstrukció fizikai térképe. A képen pirossal bekeretezve a CRK7 cDNS és a fehérje tisztítást lehetővé tévő His₆ jelölés.

A ligátumot DH5αF⁻ kompetens sejtbe transzformáltam, majd 25 mg/l kanamicin-t tartalmazó LB médiumra szélesztettem, és 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. A megjelenő telepeket kolónia PCR segítségével ellenőriztem. A reakció során C8-1 forward (CCCAAATCCAAGATGACT) és C8-2 reverz (TTTTGGCAAGAGCCGCTA) primereket használtam, az alábbi reakciókörülményeket követve: 94 °C 5 perc; 35X [94 °C 30 másodperc (sec), 55 °C 30 sec, 72 °C 30 sec]; 72 °C 4 perc 4°C∞. Az eredményt a következő ábra mutatja:

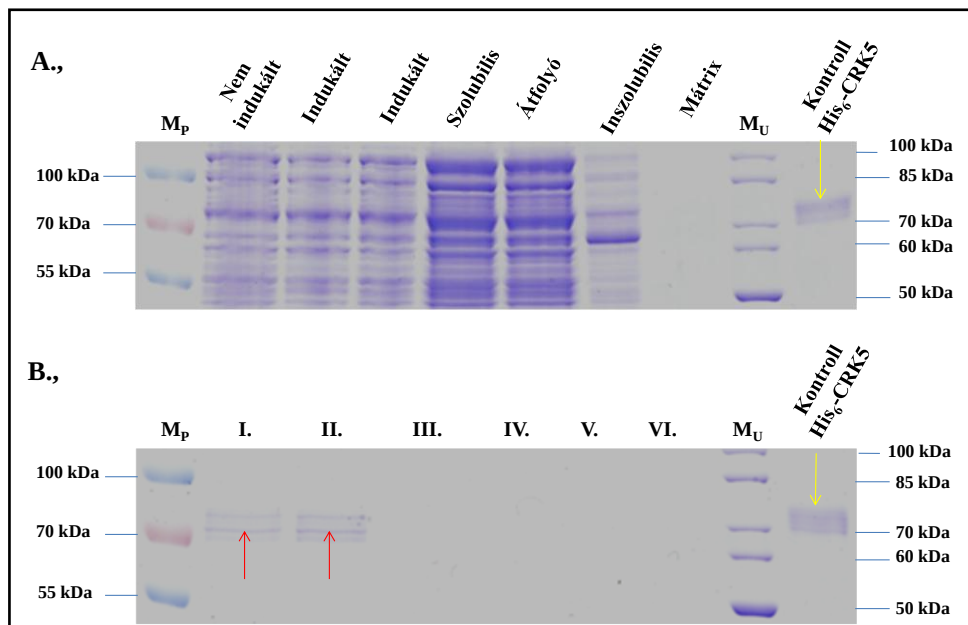


7. ábra. pET-28a (+)-CRK7 konstrukció ellenőrzése kolónia PCR segítségével

A vártnak megfelelő méretű (760 bp) fragmentet kaptam, az ellenőrzés sikeres volt.

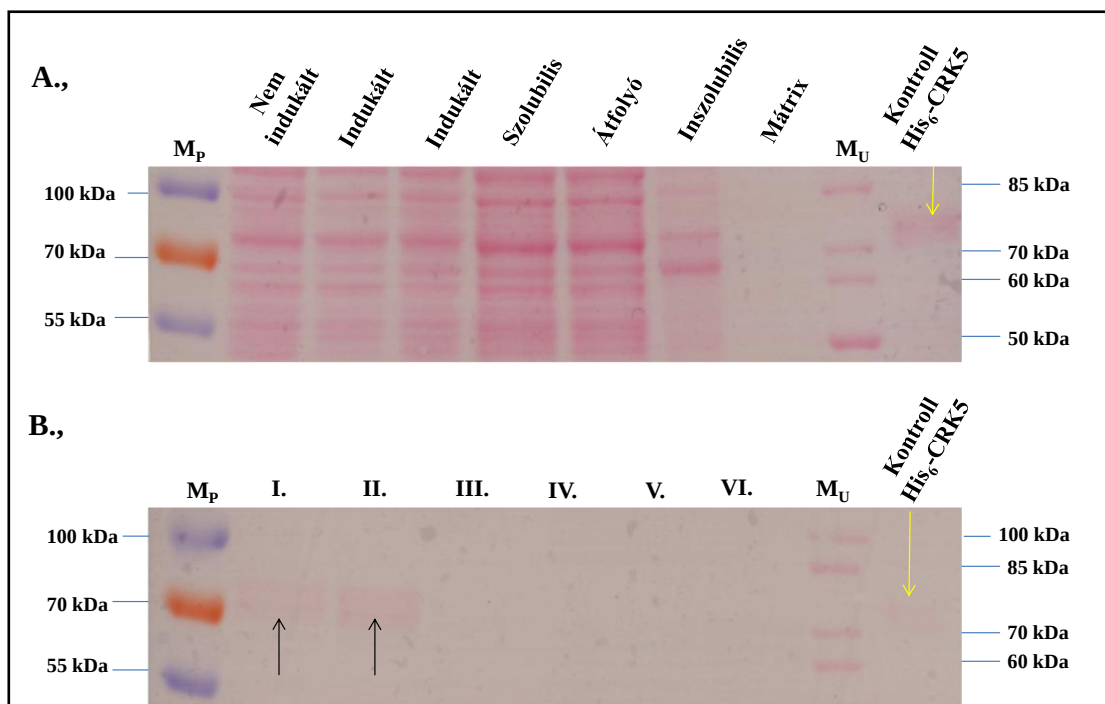
5. 1. 2. CRK7 protein kináz tisztítása baktériumból

A vektor rendszer indukálását, a fehérje túltermeltetését és tisztítását az anyagok és módszerek részben foglaltak szerint végeztem. A tisztítás során gyűjtött különböző fehérje frakciókat elektroforézissel elválasztottam, az eredményt a **8. ábra** szemlélteti.



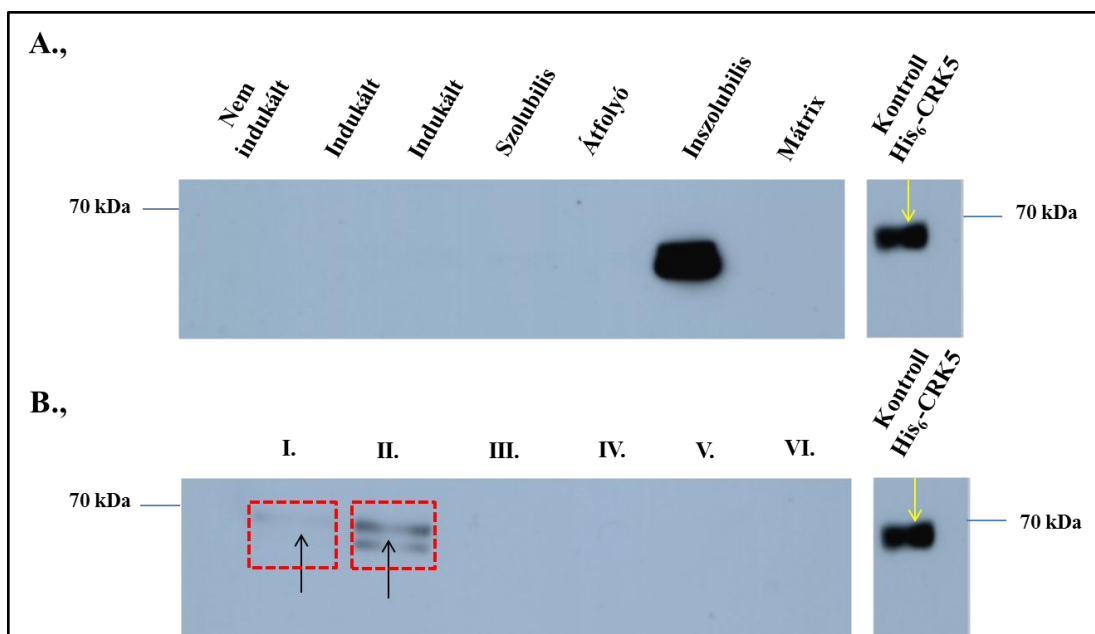
8. ábra: His₆-CRK7 protein kináz tisztítása baktériumból. Jelölések: M_p (Prestained molekulalétra, Fermentas, kat. szám: SM0671), M_U (Unstained molekulalétra, Fermentas, kat. szám: SM0661), piros nyilak: His₆-CRK7 fehérje.

A **8. ábra** „B” részén látható római számok a mátrixról leoldódott fehérje frakciókat jelölik. Jól látható, hogy az I. és II. elúció során az összes fehérje leköti az oszlopról. A molekulaméret pontosabb szemléltetése érdekében a His₆-CRK5 protein kinázt is megfuttattam 8%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélen. A CRK7 64,6 kDa, míg a CRK5 67 kDa molekulatömegű. Western-transzfert, valamint Ponceau-festést követően anti-His₆ egér monoklonális ellenanyagot 1:1000 hígításban (Roche kat. szám: 11922416001), mint elsődleges, valamint peroxidáz-kapcsolt anti-egér ellenanyagot 1:10000 hígításban (Pierce, kat szám: 31430) használva azonosítottam a tisztított His₆-CRK7 fehérjét.



9. ábra: A 8. ábrán bemutatott gélről PVDF membránra átblottolt fehérjék Ponceau-festés után (a tisztított His₆-CRK7 fehérjét fekete nyilak jelölik).

A festés után a membránt a korábban leírt módon kezeltem. A blottolás eredményét sötétszobában hívtam elő. Eltérő expozíciós időket alkalmaztam, már 0,5-1 perc után láthatóvá váltak a jelek. A 10. ábrán látható a Western-blot detekció végeredménye.



10. ábra: Western-blot végeredménye röntgen filmen előhívás után.

A képen egyértelműen látszik a molekulatömeg, illetve pozitív kontrollként alkalmazott His₆-CRK5 fehérje, valamint az ábra „B” részén az I. és II. elúció során leoldódott His₆-CRK7 fehérje által adott jelzés (az ábrán pirossal keretezve). A kép „A” részén határozott foltot kaptam az insolubilis frakció sávjában, ez alapján arra lehet következtetni, hogy a His₆-CRK7 protein kináz nagyobb részt ebben a frakcióban található. A dialízist követően a fehérjéket -80 °C-on tároltam.

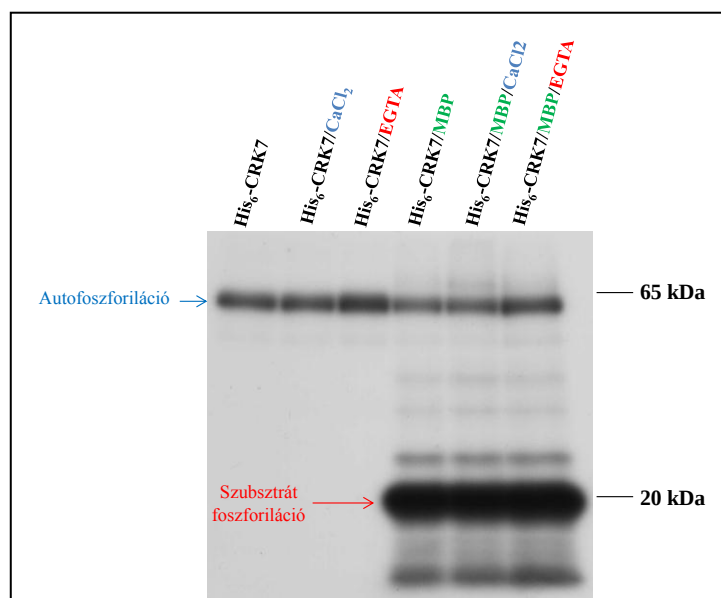
5. 2. Radioaktív kináz-aktivitás („kináz assay”) vizsgálat tisztított CRK7 fehérjével

Az aktivitás vizsgálatot tisztított CRK7 fehérjével radioaktív (γ -³²P) ATP jelenlétében hajtottam végre. A reakciók összetételét a **2. táblázat** mutatja:

His ₆ -CRK7	+	+	+	+	+	+
MBP (1μg)				+	+	+
CaCl ₂ (0,1 mM)		+			+	
EGTA (1 mM)			+			+

2. táblázat: A kináz-aktivitás vizsgálat során használt reakciók összetétele a **4. 2. 5. 3** pontban leírtak szerint, a teljes reakció térfogata minden esetben 20 μl.

A kináz-aktivitás vizsgálat végeredményét a **11. ábra** mutatja be:



11. ábra: Kináz-aktivitás vizsgálat eredménye röntgen filmen megjelenítve (48 órás expozíciós idő után).

A **11. ábra** alapján elmondható, hogy a kináz autofoszforilációja minden esetben megfigyelhető, a kalciumion és az EGTA jelenléte nem befolyásolja az aktivitását. Mesterséges szubsztrátként mielin bázikus fehérjét (MBP) adtam a reakcióhoz, amit a CRK7 protein kináz foszforilált. A kalciumion és az EGTA az MBP jelenlétében sem befolyásolta a CRK7 protein kináz működését.

5. 3. A CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációjának vizsgálata *A. thaliana* (Col-0) növényben és *A. thaliana* (Col-0) sejtszuszpenzióban

5. 3. 1. A CRK7 cDNS stop kodon PCR alapú módosítása

A pBSK II (+)-CRK7 (C8/1) donor plazmidból 10X-es hígítást csináltam, amit templátként használtam a PCR reakció során. Követve a gyártó utasításait, 1,5 U Pfu enzimet (Fermentas), M13(-20) (GTAAAACGACGGCCAGT) és EcoRV No Stop reverz (GTAAGATATCCTGCGCTTTCTGCAATGTAC) primereket használtam. Az alábbi reakciókörülményeket biztosítottam: 95 °C 1 perc; 35X [95 °C 15 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 perc], 72 °C 4 perc 4°C ∞. A folyamat eredményeként a CRK7 stop kodon egy alanin aminosavra cserélődött ki (TAG→GCA). Vastagon szedett betűtípussal jelöltem a primer szekvencián ezt a régiót. A CRK7 cDNS EcoRV restrikciós hasítási helyet is hordoz, amit aláhúzással jelöltem a primer szekvencián.



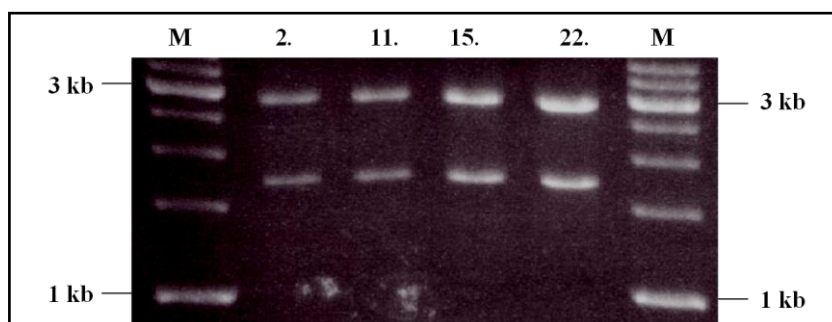
12. ábra: Stop kodon eltávolítás PCR reakciójának tesztfuttatása (M: 1 kb, GeneRuler).

Az agaróz gélen történt ellenőrzés alapján elmondható, hogy sikeres volt a PCR reakció, amit a **12. ábra** szemléltet. A PCR terméket gélből tisztítottam, majd az eluátumot és a pBSK II (+) plazmidot is emésztettem SallI, valamint EcoRV restrikciós enzimekkel. A gélből izolálást követően ligálási reakciót hajtottam végre, utána DH5αF⁻ kompetens sejtbe transzformáltam, 100 mg/l carbenicillin-t tartalmazó LB médiumra szélesztettem, majd 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. Ezt követően kolónia PCR-t végeztem az alábbi primereket használva: M13(-20) (GTAAAACGACGGCCAGT) és M13(-26) (CAGGAAACAGCTATGAC). A kolónia PCR eredményét a **13. ábra** szemlélteti. A pozitív klónokból plazmid DNS-t tisztítottam, majd teszttemésztést végeztem SallI és EcoRV restrikciós enzimekkel, amit a **14. ábra** szemléltet. A 2-es klónt szekvenáltatással ellenőriztük (SZBK DNS Szekvenáló Laboratórium).

A kapott fragmentek a megfelelő mérettartományban láthatóak.



13. ábra: Kolónia PCR pBSK II (+)-CRK7-EcoRV No Stop konstrukciót hordozó baktériumokból (-: negatív kontroll; +: pozitív kontroll; M: molekulalétra).



14. ábra: A pozitív klónok (2., 11., 15., 22.) tesztelésztése Sall és EcoRV restriktációs enzimekkel (M: molekulalétra).

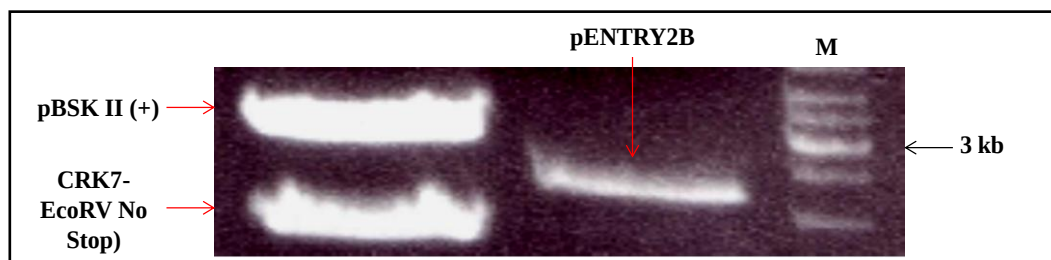
A pBSK II (+) és a CRK7-EcoRV No Stop cDNS egyértelműen jó mérettartományban található.

5. 3. 2. CRK7-EcoRV No Stop cDNS bináris expressziós vektorba klónoztása Gateway technológia felhasználásával

A kísérlet során a pBSK II (+)-CRK7-EcoRV No Stop konstrukciót (2-es klón) és a pENTRY2B vektort (2718 bp, Invitrogen) Sall és EcoRV restriktációs enzimekkel emésztettem meg (**15. ábra**). Agaróz gélből fragmentet izoláltam és a CRK7-EcoRV No Stop cDNS-t ligáltam a pENTRY2B vektorba, ezzel létrehozva az ún. „entry” klónt. Transzformáció után kolónia PCR-t alkalmaztam C8-1 és C8-2 primerekkel, a fent leírt módon (**16. ábra**). Ezt követően a pozitív klónokból plazmid DNS-t tisztítottam és a pENTRY2B-CRK7-EcoRV No Stop konstrukciót emésztettem Sall-EcoRV restriktációs enzimekkel ellenőrzés céljából.

Egy pozitív konstrukciót kiválasztva, elvégeztem az LR Klonáz reakciót. A folyamatot a gyártó (Invitrogen) által leírt módon kiviteleztem. A reakció tartalmazta: pENTRY2B-CRK7-EcoRV No Stop konstrukciót (2-es klón), pK7FWG2.0 (bináris vektor) cél vektort (ún. „destination” vektor), TE puffert és LR Klonáz reagenst. Ezt követően DH5 α F⁻ kompetens sejtbe transzformáltam a reakciót, 50 mg/l spetinomycin-t tartalmazó LB

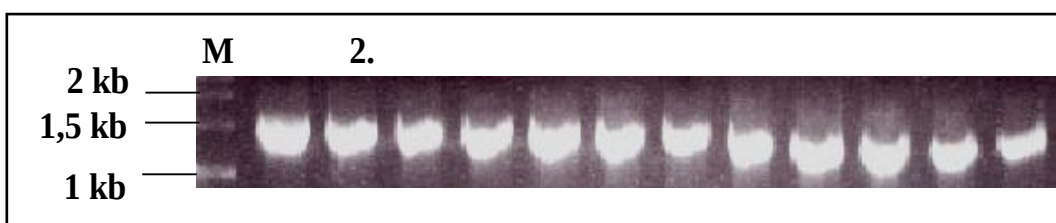
médiumra szélesztettem, majd 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. Az eredményt kolónia PCR segítségével ellenőriztem, C8-2 (gén specifikus) és p35S1 forward (vektor specifikus) (GATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGC) primereket használva (**17. ábra**).



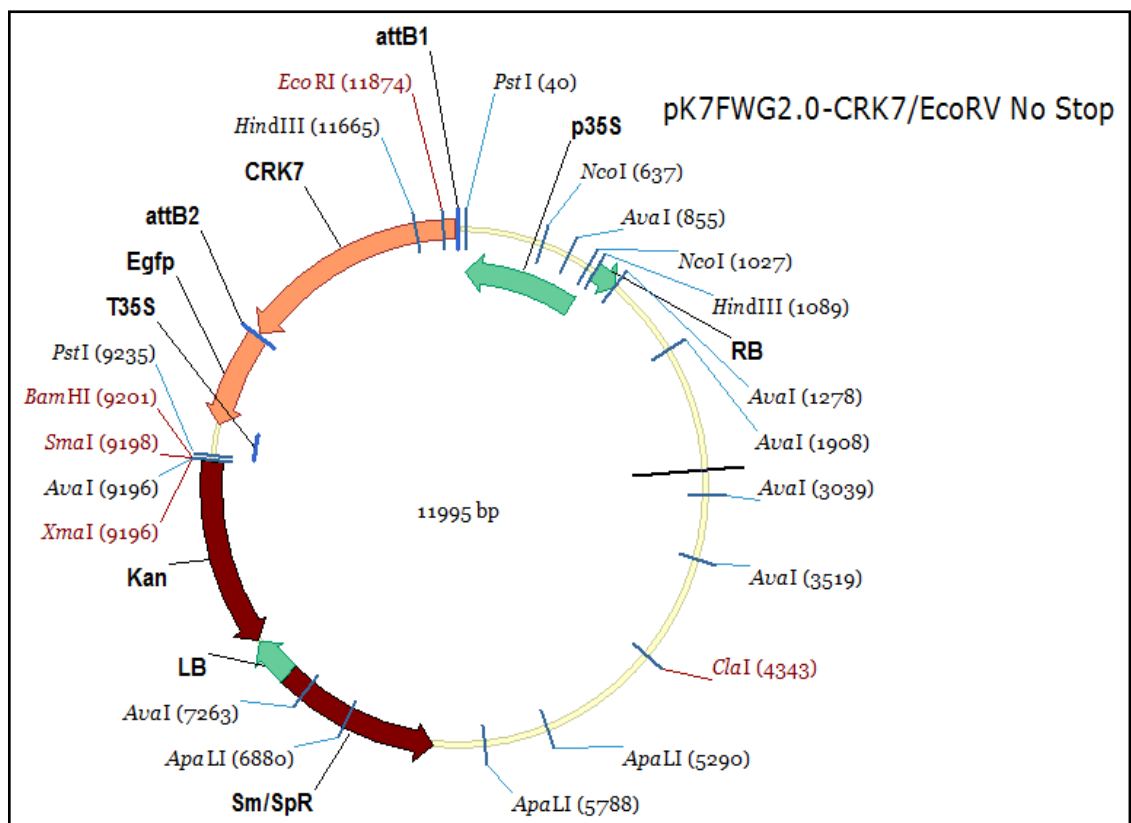
15. ábra: pBSK II (+)-CRK7-EcoRV No Stop (2-es klón) és pENTRY2B vektor Sall-EcoRV emésztést követő DNS fragment izolálása agaróz gélből (M: molekulalétra).



16. ábra: pENTRY2B-CRK7-EcoRV No Stop konstrukció ellenőrzése kolónia PCR-ral (M: molekulalétra, -: negatív kontroll, 1-7.: minta az egyedi baktérium telepekből).



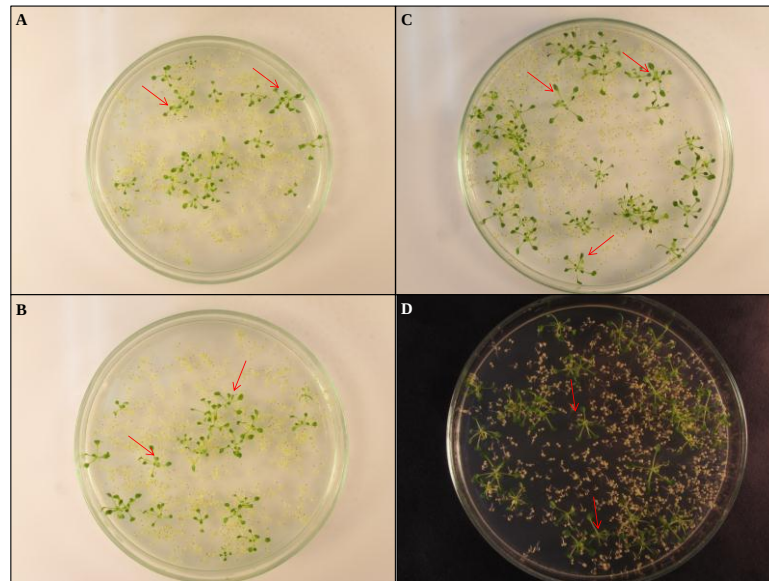
17. ábra: pK7FWG2.0-CRK7-EcoRV No stop szerkezet ellenőrzése kolónia PCR-ral.



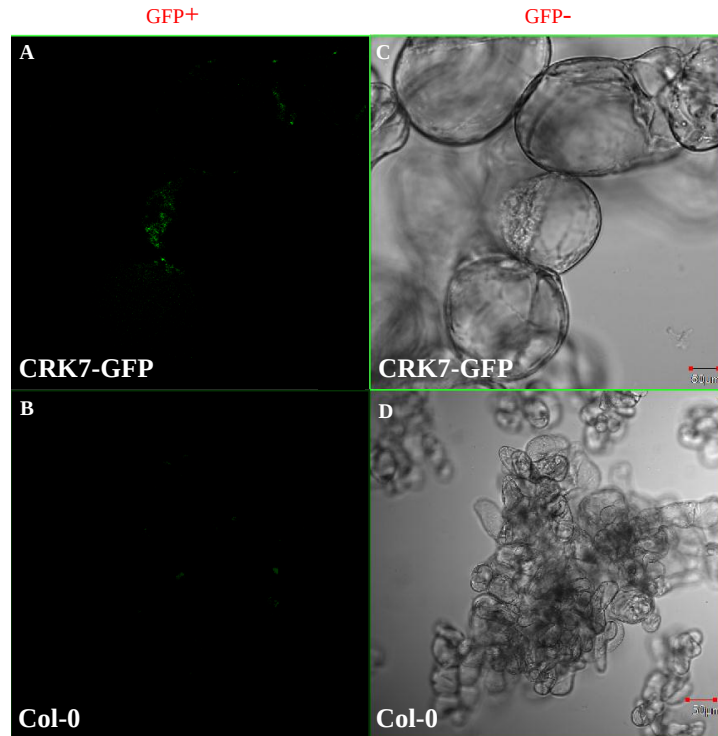
18. ábra: pK7FWG2.0-CRK7-EcoRV No Stop fizikai térképe

5. 3. 3. Lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM) vizsgálat

A 18. ábrán látható konstrukciót a korábban leírtak szerint, háromszülős konjugációval *Agrobacterium*-ba juttattam. Ezt követően a kész *Agrobacterium*-mal *A. thaliana* (Col-0) sejtuszpenzió, illetve *A. thaliana* (Col-0) növénytranszformálást hajtottam végre a 4. 2. 2. 3. fejezetben leírtak szerint. Csíranövények esetében az antibiotikum szelekció hatása már 1 hét elteltével jól látszik. A transzformáns csíranövények élénkzöld színűek, a nem transzformáns csíranövények elpusztulnak (19. ábra). A petricsészéket a frissen átrakott transzformáns csíranövényekkel függőlegesen állítva helyeztem el a növénynevelő szobában. Erre azért volt szükség, mert a mikroszkópos vizsgálatához felhasznált gyökér mintát így egyszerűbb preparálni. A transzformált sejtuszpenzióból 300 µl mennyiséget egy hat rekeszből álló műanyag kamrába tettem, majd a megfelelő mikroszkóp beállításokkal vizsgáltam a CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációját.

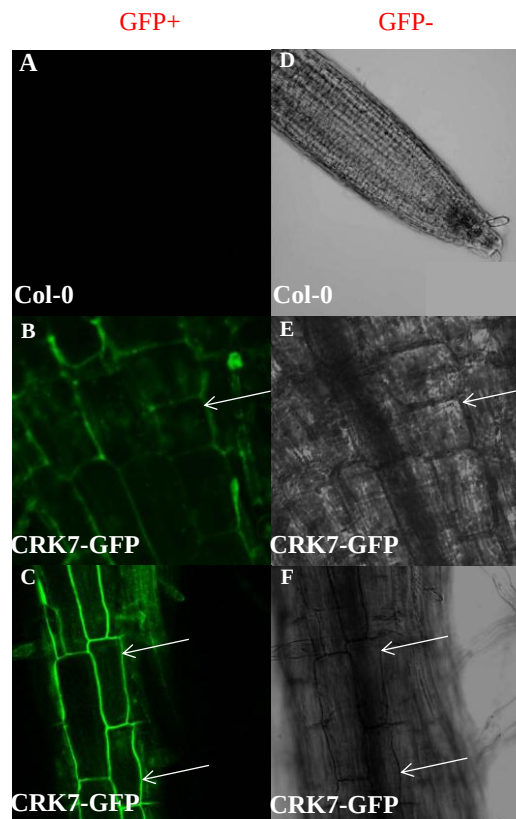


19. ábra: A kanamicin szelekció hatása a T1 magokból csíráztatott csiranövényekre világos (A,B,C) és sötét háttérben (D). A kanamicin rezisztens, transzformáns CRK7-GFP csiranövények élénkzöldek, jól nőnek, míg a nem-transzformált csiranövények sárgák és elpusztulnak.



20. ábra: A CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációs vizsgálata sejtuszuspenzióban. A vad típusú (Col-0) szuszpenzióhoz viszonyítva (B, C) a CRK7-GFP szuszpenzió sejtjei (A, C) GFP jelet mutatnak a plazmamembránban.

Többszöri, 6 hetes, majd két hónapos szelektált szuszpenzióból vett minta mikroszkópos vizsgálat során sem találtam kiemelkedően erős GFP jelet a CRK7-GFP transzformáns sejtszuszenzióban. Ez azzal magyarázható, hogy a CRK7-GFP rezisztens kolóniák a kísérlet tartalma alatt még nem tudtak kellőképpen feldúsulni, ehhez gyakran 6-12 hónapos szelekciós nyomás alatti szuszpenzió tenyésztés szükséges. A megfigyelt, viszonylag gyenge GFP jel a CRK7 plazmamembránban (PM) való lokalizációját valószínűsítette.



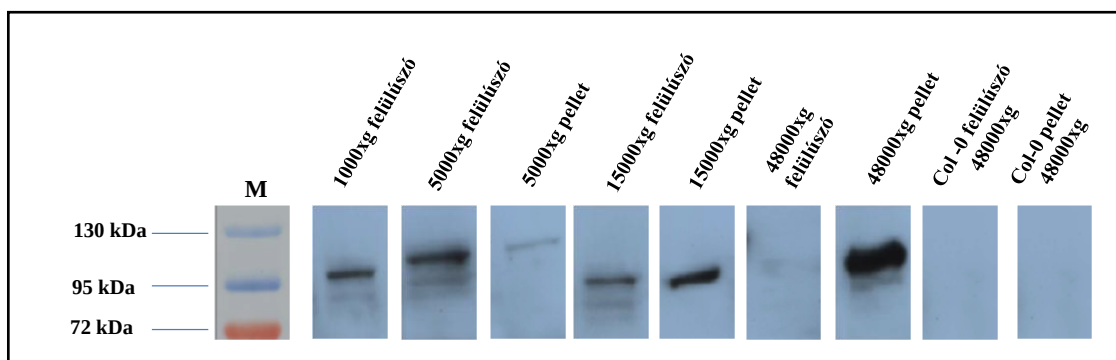
21. ábra: CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációja 10 napos T1 transzformáns csíranövényekben. A/D a vad típusú *A. thaliana* (Col-0) gyökércsúcsát, míg a B/E a CRK7-GFP csíranövény gyökércsúcsának osztódási/megnyúlási (MZ/EZ) zóna átmeneti zónájában levő epidermisz sejtjeit, C/F a CRK7-GFP csíranövény gyökércsúcsának megnyúlási (EZ) zónában lévő sejtjeit mutatja. Jól látható a CRK7-ben a GFP jel plazmamembrán (PM) lokalizációja.

A T1 transzformáns csíranövények gyökerében viszont sikerült meghatározni a CRK7-GFP fúziós fehérje helyét. A vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a CRK7 protein kináz plazmamembrán lokalizációt mutat (**21. ábra**, fehér nyilak). Ezt alátámasztja az a tény is,

hogy a CRK7 protein kináz N-terminális doménjén egy mirisztációs hely található, ami plazmamembrán (PM) lokalizációt feltételez.

5. 3. 4. A CRK7-GFP lokalizáció kimutatása differenciális centrifugálást követő Western-blot vizsgálattal

Az intracelluláris sejtservecskék differenciális centrifugálás során különböző sebességnél ülepednek le a centrifugacső aljára. A CRK7-GFP fúziós fehérje kimutatására Western-transzfert követően anti-GFP egér monoklonális ellenanyagot 1:2000 hígításban (Roche, kat. szám: 11814460001), mint elsődleges valamint peroxidáz-kapcsolt anti-egér ellenanyagot 1:10000 hígításban (Pierce, kat. szám: 31430) használva azonosítottam a CRK7-GFP fúziós fehérjét.



22. ábra: A differenciális centrifugálás után elvégzett ellenanyag reakció eredménye röntgen filmen megjelenítve (M: molekulalétra).

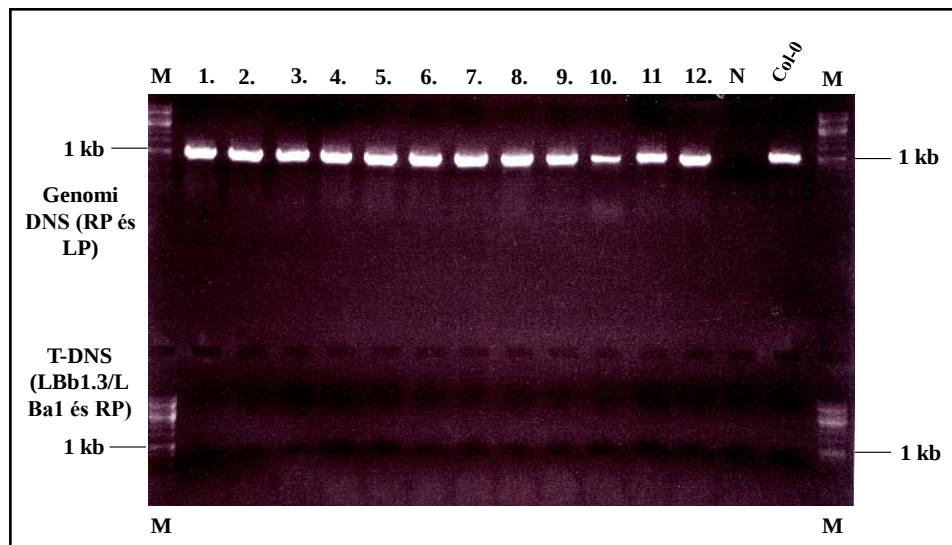
A centrifugálás sebességének emelkedésével fokozatosan ül le a CRK7-GFP fúziós fehérje a csapadék fázisba (**22. ábra**). A legmagasabb sebességnél vett mintában erős jelet kaptam. Ebben a frakcióban ülepedik ki az ún. mikroszomális frakció, plazmamembrán (PM) és egyéb belső membrán komponensek. A CRK7 protein kináz N-terminális részén található mirisztációs motívum alapján várható volt, hogy a fehérje membrán lokalizációt mutat majd, amit a nagyon érzékeny Western-blot kísérlet is alátámasztott. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok szintén alátámasztották a CRK7-GFP plazmamembránban való lokalizációját.

5. 4. A CRK7-es gén biológiai szerepének kutatása

5. 4. 1. T-DNS inszerciót tartalmazó homozigóta mutáns vizsgálata

Az *Arabidopsis thaliana* modellorganizmus előnyös tulajdonságait kihasználva napjainkban már számos T-DNS inszerciót hordozó mutáns növényi vonalat hoztak létre. Kísérleteim során az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport által korábban megrendelt SALK_054022-es mutáns növényi vonalat vizsgáltam. A mutáns növényeket

üvegházban neveltem, teljes DNS izolálás után PCR reakciót végeztem annak kiderítésére, hogy tartalmazzák-e a T-DNS inszertet. A reakció során a következő primereket használtam: RP (GAAGAGACTAGGTAAAGGGCTTGG) és LP (AGAGAAGAAGGGGCAAAACAC) primerek vad típus azonosítására. A PCR reakció során 900-1100 bp nagyságú DNS-t amplifikálnak fel. Az RP mindig a T-DNS inszerció 3' végénél van. A PCR reakció körülményei: 95 °C 2 perc; 35X [95 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 perc]; 72 °C 2 perc 4°C ∞.



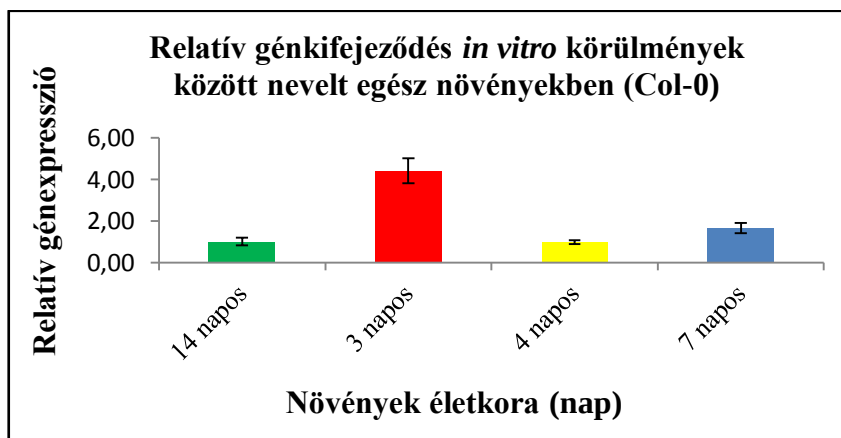
23. ábra: Különböző növényekből származó DNS mintákkal (1-12.) elvégzett PCR reakció eredménye (N: negatív kontroll; Col-0: pozitív kontroll; M: molekulalétra).

A **23. ábrán** bemutatott PCR reakció eredményéből látszik, hogy a növények nem tartalmazzák a T-DNS-t, nem sikerült se homozigóta, se heterozigóta mutánszt azonosítani viszonylag nagyszámú (60 db) mintából. Ennek oka, hogy valószínűleg nem a megfelelő T-DNS inszerciót hordozó vonalat kaptuk a SALK intézettől. A jövőben újra megszeretném rendelni a tényleges SALK_054022-es mutánszt, valamint ezen felül további T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns növényi vonalakat, hogy kísérleteimet tovább folytathassam.

5. 4. 2. Real-Time PCR (QRT) vizsgálat

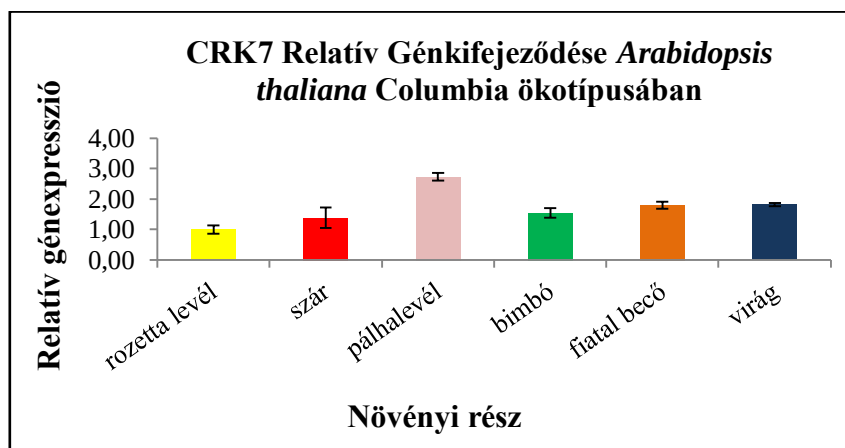
Üvegházi és *in vitro* növényekben, növényi részekben belső kontroll génhez (*ACT*) viszonyítva vizsgáltam a *CRK7* gén kifejeződésének mértékét. A kísérlet eredményeinek kiértékelésekor az ún. delta-delta Ct érték módszert alkalmaztam. A Ct érték egy ciklus számot jelöl, amelynél a cDNS templátról képződő termék mennyiségét a detektor kvantitatívan képes értékelni. Minél alacsonyabb ez a szám, annál magasabb az adott gén

expressziója. A delta-delta Ct érték módszer a Ct értéket átalakítja normalizált relatív expressziós értékke (szint) azáltal, hogy a vizsgált mintában lévő célgén Ct értékét a kalibrátor mintához viszonyítja és a belső kontroll gén Ct értékéhez (jelen esetben *ACT*).



24. ábra: Különböző korú, *in vitro* körülmények között nevelt teljes növények gén expressziója látható.

A 14 napos növényben mért gén kifejeződés értékét egynek tekintve, a 3 napos egész növényben közel ötször nagyobb, 1 hetes mintában majdnem kétszerese, a 4 naposban pedig közel azonos a génexpresszió mértéke.



25. ábra: A *CRK7* gén relatív expressziója különböző, 6 hetes üvegházi növényekből gyűjtött mintákban (Col-0).

A rozettalevélhez viszonyítva a pálhalevélben tapasztaltam a legmagasabb értéket, közel háromszor akkora relatív génkifejeződést (**25. ábra**). A fiatal becőben mért adat majdnem kétszer nagyobb a rozetta levélhez képest. A virágban detektált érték szinte azonos a fiatal becőben tapasztalttal. A bimbó és szár expressziós adatai között kicsi az eltérés, mindkettőben kb. másfélszer magasabb a relatív expressziós szint, mint a kalibrátor funkciót betöltő rozetta levélben.

6. Összefoglalás

Kísérleteim során a CDPK-SnRK szupercsalád, CRK családjába tartozó CRK7-es protein kinázt tanulmányoztam. A teljes hosszúságú CRK7 cDNS-t sikeresen beklónoztam indukálható pET-28a (+) bakteriális expressziós vektorba, így a fehérjét His₆ jelöléssel láttam el és affinitás kromatográfián alapuló módszerrel tisztítottam túltermelő *E. coli* baktériumból. A kitisztított fehérjével radioaktív kináz-aktivitás vizsgálatot végeztem. Az eredményekből kiderült, hogy a mesterséges szubsztrátként felkínált mielin bázikus fehérjét (MBP) képes foszforilálni, továbbá a CRK7-es kináz működését nem befolyásolja a Ca²⁺ és az EGTA jelenléte, vagyis az autofoszforiláció és a szubsztrát-foszforiláció jelensége független ettől a két komponenstől.

A CRK7 cDNS stop kodonját PCR alapú módosítással eredményesen eltávolítottam, majd több lépésben létrehoztam egy ún. „entry” klónt. Ezt követően Gateway technológiát felhasználva LR Klonáz reakcióval sikeresen klónoztam kanamicin rezisztenciagént tartalmazó bináris expressziós vektorba, így a CRK7 cDNS-t fluoreszcens módon detektálható fúziós GFP riportergénnel láttam el. A 35S::CRK7-GFP konstrukciót *Agrobacterium* közvetített transzformációval *A. thaliana* (Col-0) növénybe és *A. thaliana* (Col-0) sejtszuspenzióba juttattam. Az antibiotikumon szelektált elsődleges T1 csíranövényekben és szuspenzióban lézerpásztázó konfokális mikroszkóp (LSM), valamint differenciális centrifugálást követő Western-blot vizsgálat alkalmazásával meghatároztam a CRK7-GFP fúziós fehérje lokalizációját. A szelektált transzformáns sejtszuspenzióban többszöri (jelen esetben két hónapos szelekciót követő) mikroszkópos vizsgálat után sem találtam erős GFP jelet. Az elsődleges T1 csíranövények gyökerében azonban a CRK7 protein kináz plazmamembrán (PM) lokalizációját tapasztaltam, amit a T1 transzformáns növényeken végzett differenciális centrifugálást követő Western-blot vizsgálat eredménye is igazolt.

A SALK_054022-es mutáns növényi vonallal végzett kísérletek során nem megfelelő eredményeket kaptam, így a jövőben további, szintén T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns növényi vonal tanulmányozásával szeretném folytatni a CRK7 gén biológiai funkciójának megállapítására irányuló kutatásaimat. Üvegházi növényekből származó *A. thaliana* (Col-0) mintákat real-time technikával vizsgálva megállapítottam, hogy a CRK7 génexpresszió mértéke a rozetta levélhez viszonyítva a pálhalevélben nagyjából háromszor akkora. *In vitro* módon nevelt növényeket összehasonlítva, a 3 napos mintában ötszöröse a CRK7 génkifejeződése a 14 napos növényből vett mintához képest.

7. Felhasznált irodalom

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815

Bennett, M. J., Leitch, I. J., Price, H. J., Johnston, J. S., (2003) Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) Using Flow Cytometry Show Size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany* 91: 547-557

Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54

Cindy R., Velten, W. J., (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector system In: *Plant Molecular Biology Manual*, Volume B 1 (Gelvin S.G., and Schilperoot R.A., eds.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Belgium

Clough, S.J., Bent, A.F., (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, Dec, 16(6): 735-43

Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S. M., Hrabak, E. M., Harmon, A. C., Pickard, B. G., Harper, J. F., (2003) Subcellular Targeting of Nine Calcium-Dependent ProteinKinase Isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, August, Vol. 132, pp. 1840–1848

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347

Du, W., Wang, Y., Liang, S., Lu, YT., (2005) Biochemical and expression analysis of an *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase-related kinase. *Plant Science*, 168: 1181–1192

Farmer, P. K., Choi, J. M. (1999) Calcium and phospholipid activation of recombinant calcium dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota L.*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1434: 6-17

Fodor, F., Zsoldos, F., (1998) A kalcium 3: 150-153, (szerkeztő: Láng ferenc), ELTE Eötvös Kiadó, Budapest

Furumoto, T., Ogawa, N., Hata, S., Lzui, K. (1996) Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities. *FEBS Lett.*, 396: 147-151

Hanahan D.(1985) *Techniques for transformation of E. coli. in DNA cloning: a practical approach, ed Glover D. M. (IRL Press, Oxford, United Kingdom), 1:109–135*

Harmon, A. C., Gribskov, M., Harper, J. F., (2000) CDPKs– a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trend sin Plant Science*, April, Vol. 5, No. 4

Hashimoto, K., Kudla J., (2011) Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93 2054-2059

Hrabak, E. M., (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. is a potential substrate of AtCRK3 involved in leaf senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 119–126

Koncz, C., Schell, J., (1986) The promoter T-DNA gene 5' controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, 204: 383-396

Koncz C., Martini N., Szabados L., Hroudá M., Bachmair A., Schell J. (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: *Plant Molecular Biology Manual*, Volume B2 (Gelvin S.G., and Schilperroot R.A., eds.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Belgium

Koncz C és Rédei GP, (1999) A molekuláris genetika eszközei : Agrobaktérium T-DNS és Arabidopsis. In: Balázs E., Dudits D., Dusha I, Endre G, Fehér A (eds) *Molekuláris Növénybiológia: Szemelvények*. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp. 323-452

Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Li, R.J., Hua, W., Lu, Y.T., (2006) Arabidopsis cytosolic glutamine synthetase AtGLN1;1

Meinke, D. W., (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis.

Plant Physiology, June, Vol. 132, pp. 666-680

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Science, October, Vol. 282, pp. 662

Wang, Y., Liang, S., Xie, QG., Lu, YT., (2004) Characterization of a calmodulin-regulated Ca²⁺-dependent-protein-kinase related protein kinase, AtCRK1, from Arabidopsis. Biochem. J. 383: 73–81 (Printed in Great Britain)

Zhang L., Liu B.F., Liang S, Jones, R.L., Lu Y.T. (2002) Molecular and biochemical characterization of a calcium/calmodulin-binding protein kinase from rice. Biochem J 368: 145–157

Internetes források:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://plantsp.genomics.purdue.edu/>

<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>

http://gateway.psb.ugent.be/search/index/fusion_proteins/any

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Cséplő Ágnesnek, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport tudományos főmunkatársának, aki témavezetőmként mind elméleti, mind gyakorlati munkámat hasznos szakmai tudásával segítette. Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabados Lászlónak, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport laborvezetőjének, hogy lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzéséhez. Köszönettel tartozom Dr. Pécsváradi Attila egyetemi docensnek, aki belső konzulensként figyelemmel kísérte és mindenben segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Rigó Gábornak, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport tudományos segédmunkatársának, hiszen szakmai irányítása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Szeretném megköszönni az alapvető molekuláris biológiai, biokémiai és növénybiológiai módszerek elméleti és gyakorlati betanításában tanúsított türelmét, önzetlen segítségét. Köszönöm elméleti oktatását és az azt követő fokozott figyelmét a radioaktív anyaggal végzett kísérletem során. Szeretném megköszönni, hogy tudása és tapasztalata legjavának átadásával elősegítette szakmai fejlődésemet.

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Domoki Mónikának, a Funkcionális Sejtbiológia Csoport tudományos munkatársának a Real-Time PCR technika betanítását. Köszönettel tartozom Dr. Ferhan Ayaydin-nak, a Mikroszkópos Sejtanalízis (CI) Laboratórium vezetőjének és Dr. Cséplő Ágnes témavezetőmnek, a lézerpásztázó konfokális mikroszkóp technika betanításáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Király Annamária laborasszisztensnek, valamint a csoport minden tagjának, hogy segítségükkel hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

9. Nyilatkozat

Alulírott Urbancsok János, II. évfolyamos Biológus MSc szakos hallgató kijelentem, hogy a dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Szeged, 2012. április 16.

.....
Aláírás