

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

---

**A NÖVÉNYI NRP FEHÉRJÉK LEHETSÉGES SZEREPE A  
HISZTON DEFOSZFORILÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN,  
ÉS A HŐSTRESSZ VÁLASZBAN.**

*Bíró Judit*

*Témavezető: Dr. Fehér Attila*

---

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet

Funkcionális Sejtbiológia Csoport

---

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

---

Szeged

2013

---

# Tartalomjegyzék

---

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés.....	7
Előzmények.....	7
A NAP1 fehérjecsalád .....	8
A NAP1 fehérjék állatokban.....	10
A növényi NAP1 fehérjék.....	13
Az NRP proteinek állati homológjai emlősökben: a SET/I <sub>2</sub> <sup>PP2A</sup> fehérje.....	14
A SET/I <sub>2</sub> <sup>PP2A</sup> szerepe ecetmuslicában .....	17
A lúdfű NRP fehérjék .....	18
Célkitűzéseink.....	21
Anyagok és módszerek.....	22
<i>In silico</i> szekvencia analízis.....	22
Növények .....	22
A növények csíráztatása és a stresszkezelések.....	23
A Gateway klónozás .....	24
Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása .....	25
Ellenanyagok termeltetése és tisztítása.....	25
Növényi fehérjék izolálása .....	26
Sejtek frakcionálása .....	26
Immunoblot (Fehérjék immunológiai detektálása) .....	27
Foszfatáz aktivitás mérések .....	28
Ko-immunoprecipitálás.....	29

Kromatin immunoprecipitációs esszé (ChIP).....	29
Lúdfű protoplasztok transzformálása .....	30
Immunhisztokémia .....	31
Fluoreszcencia kiégetés (FLIP) .....	32
RNS tisztítás, cDNS szintézis .....	32
Valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció .....	33
Eredmények.....	36
A lúdfű NRP fehérjék detektálása 37 kDa molekulásúly magasságában SDS- poliakrilamid gélben.....	36
A lúdfű NRP fehérjék kifejeződése különböző szervezetben .....	37
A növényi NRP fehérjék gátolják a PP2A és a PP1 enzimeket <i>in vitro</i> .....	38
Az <i>Arabidopsis thaliana</i> NRP1 fehérje gátolja a hiszton H3 <sub>(pSer10)</sub> At PP2A által végzett defoszforilációját <i>in vitro</i> .....	41
Az NRP fehérjék <i>in vivo</i> kölcsönhatnak a PP2A <sub>C</sub> és a hiszton H3 <sub>(pSer10)</sub> molekulákkal. 42	
A növényi NAP fehérjék is gátolják a PP2A aktivitását <i>in vitro</i> .....	44
A hiszton H3 defoszforiláció és az NRP-k lehetséges szerepe a transzkripció szabályzásában .....	46
Az NRP fehérjék nem szükségesek a hősokk gének átíródásához.....	47
A lúdfű NRP fehérjék sejtbeli lokalizációja .....	48
További bizonyítékok az At NRP1 sejtmagi lokalizációjára .....	50
Az NRP-k hősokk hatására erősen kötődnek a kromatinhoz .....	52
Az NRP-k hősokkon kívül más fajta stressz hatására nem kötődnek a kromatinhoz ...	55
Az At NRP1-túltermelő növények ellenőrzése .....	56
Az AtNRP1-túltermelő növények hőtűrése .....	58
Eredményeink összefoglalása.....	61
Az eredmények értékelése.....	62

A növényi NRP fehérjék hatása a szerin/treonin foszfatázokra.....	62
Az NRP fehérjék lehetséges szerepe a transzkripció szabályzásában a hiszton H3 <sub>(pSer10)</sub> defoszforilációján keresztül.....	63
A lúdfű NRP proteinek sejtbeli elhelyezkedése .....	65
Az NRP mutáció és az At NRP1 túltermelésének hatásai .....	65
Összefoglaló .....	68
Summary .....	71
Köszönetnyilvánítás .....	74
Irodalomjegyzék .....	75

---

## Rövidítések jegyzéke

---

At	Arabidopsis thaliana
2,4-D	2,4-diklórfenoxiecetsav
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
ChIP	kromatin immunoprecipitációs esszé
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DTT	ditiotritol
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FLIP	fluoreszcencia kiégetés (fluorescence loss in photobleaching)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
HeLa	Henrietta Lacks méhnyakrákos betegből származó sejtvonal
HIS	hisztidin
hiszton H3 <sub>(pSer10)</sub>	tizedik szerin oldalláncon foszforilált hiszton H3
HSP	hősokk fehérje
INHAT	Inhibitor of Histone Acetyl Transferases
IPTG	izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozid
mRNS	hírvivő RNS
Ms	Medicago sativa
MS	Murashige és Skoog táptalaj
NAP1	Nucleosome Assembly Protein 1
NES	nukleáris export szignál
NRP	Nucleosome Assembly Protein 1-Related Protein
PCR	polimeráz láncreakció

PEG	polietilén-glikol
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
PP1c	Protein Foszfataz 1 katalitikus alegysége
PP2Ac	Protein Foszfataz 2A katalitikus alegysége
PVDF	polivinilidén-difluorid
SER	szerin
SDS-PAGE	nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TAIR	The Arabidopsis Information Resource adatbázis
T-DNS	Ti plazmid transzfer-DNS-e

---

# Bevezetés

---

## Előzmények

Vizsgálataink középpontjában az NRP fehérjék (Nucleosome Assembly Protein 1-Related Protein) álltak. Egy lucerna (*Medicago sativa*) NRP fehérje kódoló szekvencia szakaszát kutatócsoportunkban korábban egy cDNS kivonásos klón könyvtárból izolálták, mint egy a 10  $\mu\text{M}$  2,4-D kezelés hatására indukálódó gént reprezentáló cDNS-t [1]. A 2,4-D egy növényi hormon, az auxin mesterséges analógja, amely a kísérletekben vizsgált lucerna levél protoplasztokhoz adva alacsony koncentrációban (1  $\mu\text{M}$ ) kalluszképződést indukált, magas koncentrációban (10  $\mu\text{M}$ ) viszont a szomatikus embriogenezis útjára indította a protoplasztokat. Dr. Domoki Mónika valós idejű kvantitatív PCR segítségével azt is kimutatta, hogy a csoportunkban azonosított lucerna NRP gén(ek) (mivel a lucerna genomot még nem szekvenálták meg, nem tudjuk, hány NRP gén van bennük) nem csak a szomatikus embriogenezis indukációjakor mutatott magasabb kifejeződést, hanem a későbbi embrió differenciálódási szakaszban is [1].

A cDNS által kódolt fehérje szekvenciáját megvizsgálva megállapítást nyert, hogy az állati SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjével jelentős hasonlóságot mutat. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> egy multifunkciós fehérje, amely többek között részt vesz a transzkripció[2], [3], a hiszton deacetiláció[4], az apoptózis [5], és a sejtciklus szabályzásában [6], [7], mindemellett pedig foszfatáz gátló hatása is ismert [8].

A belgiumi székhelyű együttműködő partnerünk, a CROPDesign cég a lucerna szekvencia alapján izolálta az *Arabidopsis thaliana* NRP1 (At NRP1) gén (AT1G74560) cDNS-ét és túltermeltette az At NRP1 fehérjét rizs növényekben, aminek következtében jelentősen (15-28%) megnövekedett a terméshozam a transzgenikus növényekben (szabadalom EP 1732378). Ez tovább erősítette bennünk azt a törekvést, hogy a növényi NRP fehérjék funkcióját megismerjük, és további kísérleteket tervezzünk velük.

## A NAP1 fehérjecsald

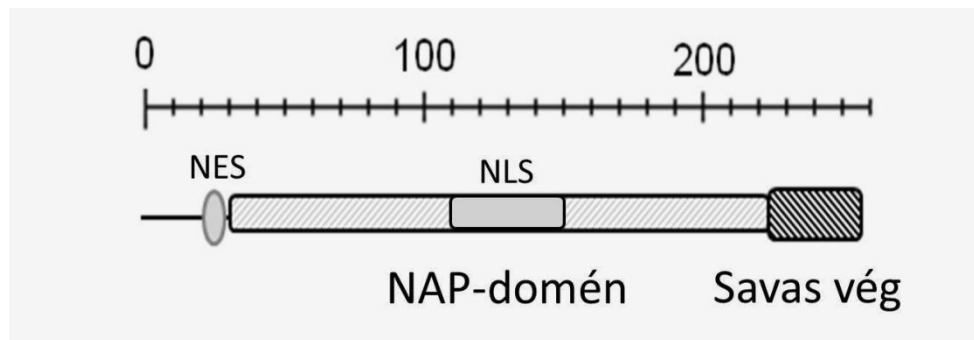
A lucerna és lúdfú NRP fehérjék aminosav sorrendjük alapján a NAP1 fehérjecsald tagjai, melynek a névadó tagja az emberi Nucleosome Assembly Protein1 (NAP1) fehérje [9].

A Nucleosome Assembly Protein 1 (NAP1) fehérje homológjai általánosn előfordulnak eukariótákban [9]. Eredetileg hiszton chaperoneként (dajka fehérje) és kromatin szerveződési faktorként azonosították őket [10], azonban ma már ettől eltérő szerepük is ismert. Részt vesznek a transzkripció [11], [12], és a sejtosztódás szabályzásában [13], és a hisztonok sejten belüli szállításában is [14]. A NAP1 fehérjecsald tagjai savas karakterú fehérjék. Mindegyikük tartalmaz egy konzervált központi NAP domént. Ezen kívül hordoznak egy erősen savas C-terminális domént, és egy változó hosszúságú N-terminális kezdeti szakaszt [9]. A NAP domén felelős a hisztonokkal való kölcsönhatásért, és a nukleoszóma összeszerelés szabályozásáért [15]. A C-terminális savas végződés összetételét tekintve konzervált a fehérjecsald tagjai között, azonban változó hosszúságú [16]. A 256 aminosav hosszúságú At NRP1 fehérje is rendelkezik a központi NAP doménnel, savas aminosavakban gazdag C-terminális végződéssel, ezen felül pedig egy lehetséges sejtmagi export szignált is tartalmaz, a 29. lizin aminosav környékén, valamint egy központi elhelyezkedésű feltételezett két tagú sejtmagi lokalizációs szignált (1. ábra).



### A lúdfű NRP1 aminosav sorrendje:

MVADKSKKSKIEEKGEEENLEQIDAELVLSIEKLQEIQDDLEKINEKASDEVLEVEQKY  
NVIRKPVYDKRNEVIQSIPGFWMTAFLSHPALGDLLTEEDQKIFKYLSLEVEDAKDV  
KSGYSITFHFTSNPFFEDAKLTKTFTFLEEGTTKITATPIKWKEGKGLPNGVNHDDKK  
GNKRALPEESFFTWFTDAQHKEDAGDEIHDEVADIKEDLWSNPLTYFNNDADDEEDF  
DGDDDGDEEGEEDDDDEEEEDGEE

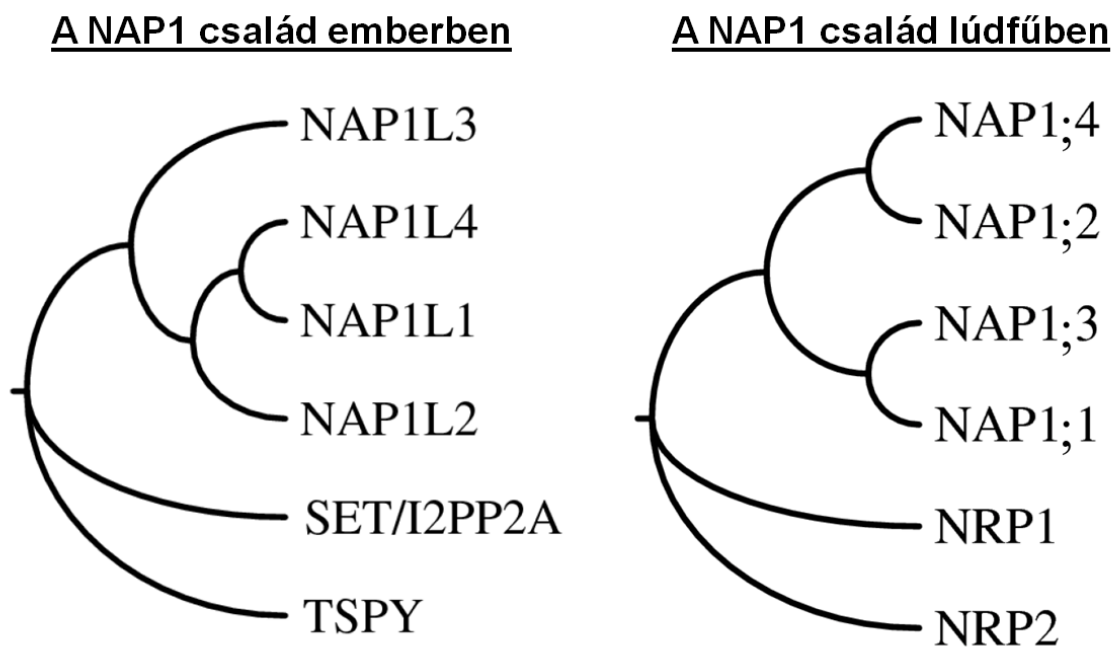


#### 1. ábra. Az At NRP1 fehérje aminosav sorrendje és szerkezete

Az At NRP1 fehérje tartalmaz egy lehetséges nukleáris export szignál szakaszt (NES; az interneten elérhető NetNES szoftver által jószolt, a szekvenciában dőlt betűvel jelölt), egy feltételezett két tagú sejtmagi lokalizációs szignált (cNLS; az interneten elérhető NLSMapper program által jószolt, a szekvencián aláhúzással jelölt), egy a NAP1 család tagjai között konzervált NAP domént, és egy savas bázisú aminosavakban gazdag C-terminális végződést.

A NAP1 családnak egyetlen képviselője található meg élesztőben [17], az eukarióta élőlények azonban számos NAP1 homológgal rendelkeznek, beleértve a növényeket is (2. ábra). Ide tartoznak az emlős NAP1-szerű hiszton chaperone fehérjék (NAP1-Like proteins, NAP1L1-NAP1L4); a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> multifunkciós fehérje; a humán TSPY (Testis-Specific Protein Y-Encoded), amely fehérjét here tumorban írták le, és feltételezhetően a sejtproliferációban és a spermatogenezisben vesz részt [18], [19]; valamint az egér CINAP (Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase-Interacting Nucleosome Assembly Protein) fehérje, amely magas szinten fejeződik ki az agyban, és részt vesz a génkifejeződés szabályozásában [20].

Növényekben a NAP1 fehérjéknek szintén számos fajtája fordul elő. Ezentúl, a NAP1 fehérjék mellett a növények is rendelkeznek a NAP1 fehérjékkel rokon, de külön csoportot alkotó fehérje csoporttal, az NRP-vel (*NAP1-related protein*), melyek a humán SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje közeli rokonai. A lúdfű NAP1 család négy NAP1 fehérjét (NAP1;1, NAP1;2, NAP1;3, és NAP1;4), és két NAP1 rokon NRP fehérjét (NRP1 és NRP2) tartalmaz (2. ábra).



**2. ábra. Az emberi és a lúdfű NAP1 fehérjék családfája.**

A filogenetikai fa megjelenítése Drawgram programmal valósult meg, a Phylogeny.fr internetes oldal segítségével [21], az alábbi GenBank nyilvántartási számokkal rendelkező aminosav szekvenciák felhasználásával: NAP1L1 (P55209), NAP1L2 (Q9ULW6), NAP1L3 (Q99457), NAP1L4 (Q99733), TSPY (Q01534), SET/I2PP2A (Q01105.3), NAP1;1 (Q9SZI2), NAP1;2 (Q9ZUP3), NAP1;3 (Q94K07), NAP1;4 (Q9LIC0), NRP1 (Q9CA59), NRP2 (Q8LC68).

### A NAP1 fehérjék állatokban

A *nucleosome assembly protein 1* (NAP1) fehérjét először hiszton chaperoneként azonosították HeLa sejtekben (emberi méhnyakrák sejtvonala) [10]. A hisztonok négy

fajtája, a hiszton H2A, H2B, H3 és H4 egy oktamer (8 részből álló) egységet alkotva a nukleoszómák alapját képezi. Erre tekeredik a DNS, minden egyes hiszton oktameren két csavarulatot hozva létre [22]. A sejtciklus S fázisában történő DNS replikáció során a hisztonok leválnak a kromoszómákról, hogy a leánysejtekben a DNS molekulákkal újra kromatinná szerveződjenek [23]. A hisztonok cserélődése, átszerveződése azonban nem csak mitózis alatt történik meg. Újnan szintetizálódott hiszton variánsok épülnek be a kromatinba transzkripció, DNS javítás, és rekombináció során is [24]. A hiszton chaperone-ok a hisztonokhoz kötődnek, és részt vesznek a kromatin folytonos újraszerveződésében, ezen kívül megakadályozzák az erősen pozitív töltésű hisztonok és az erősen negatív töltésű DNS spontán aggregációját [25].

A NAP1 specifikusan a hiszton H2A és H2B proteinekkel hat kölcsön, és segíti azok kromatinná csomagolódását mitózis során [26]. A nukleoszómák összeszerelődésének első lépéseként két-két hiszton H3 és hiszton H4 kötődik a DNS-hez egy tetramert alkotva. Ebben más szabályzó faktorok vesznek részt, elsősorban a *chromatin assembly factor-1* (CAF-1) és a *replication coupled assembly factor* (RCAF) [27]. Ezután történik a másik két hiszton molekula nukleoszómába csomagolódása, a NAP1 közbenjárásával [28].

A hisztonok bázikus karakterű fehérjék, a hiszton chaperone-ok pedig, csakúgy, mint a NAP1 fehérje, magas számban tartalmaznak savas bázisú aminosavakat. Kimutatták azonban, hogy a hisztonokhoz való kötődéshez nem szükséges sem a NAP1 N-terminális vége (első 73 aminosav), sem a savas C-terminális domén (366–417-ig terjedő aminosavak). A NAP1 központi régiója elégséges a kromatin összeszerelődésében betöltött szerepéhez, a C-terminális domén nélkül azonban nem képes a már összeszerelt nukleoszómákból a hiszton H2A és H2B fehérjéket kimozdítani [15].

Emberben négy NAP1-szerű (*NAP1-Like*) fehérje található, más és más funkcióval [29]. A NAP1L1 részt vesz a DNS replikációban a kromatin formálását modulálva, és hozzájárul a sejtosztódás szabályzásához [30]. A NAP1L2 egy agyszövet-specifikus fehérje, amely az idegsejtek osztódását szabályozza [31]. A NAP1L3 génje X kromoszómán kódolt, és egy olyan génrégióban található, amely számos mentális retardációért felelős [32]. A NAP1L4, vagy más néven NAP2 pedig kölcsönhat hisztonokkal, és a citoplazma és a sejtmag között ingázik [33], [34].

Míg a biokémiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a NAP1 a kromatin összeszerelődésének regulátora, addig a genetikai vizsgálatok más funkciót is feltételeznek. Élesztőben a NAP1 mutációja befolyásolta a gének közel 10%-nak a kifejeződését [35]. Ezen kívül a mutáns törzsek a sejtciklus folyamatában is károsodnak: késleltetett mitózis miatt meghosszabbodott sarjak jönnek létre [36]. (Nem csak az élesztő NAP1 szabályozza a sejtosztódást, hanem a *Xenopus* NAP1 fehérjék is, kölcsönhatva B-típusú ciklinekkel [37]. A NAP1 mutáció azonban nem letális élesztőre nézve [35]. Az ecetmuslica életképességét ezzel szemben drasztikusan csökkentette a NAP1 delécióna [38]. Az egyik egér NAP1-homológ, a NAP1L2 mutációja embrióletalitást okoz hibás idegfejlődés miatt [31].

A kromatin összeszerelésében betöltött szerepének megfelelően az ecetmuslica NAP1 a sejtmagban található a sejtciklus S fázisa alatt (DNS megkettőződés, új nukleoszómák létrejötte), míg a G2 szakaszban elsősorban citoplazmikus [39]. Hasonlóan, a humán NAP1L4 a citoplazmában van jelen G0/G1 fázisban, és a sejtmagba vándorol S fázis alatt [33].

A NAP1 nem csak a hisztonok kicserélődésében és a nukleoszómába való csomagolódásában vesz részt, hanem szabályozza a hiszton H2A és H2B molekulák sejtmagba történő felvételét is, a sejtmag és a citoplazma között ingázva [40]. Mint minden más sejtmagba szállítandó fehérje, a hisztonok is nukleáris import receptorokhoz, importinokhoz kötődnek a sejtmaghártyán, amelyek aztán bejuttatják őket a sejtmagba. A hiszton H2A és H2B molekulák elsődleges importinja élesztőben a Kap114p [40]. Vele alkot komplexet a NAP1, és ezzel megnöveli a Kap114p-nak a hiszton H2A és H2B fehérjék nukleáris import szignáljához való affinitását. Ezzel szemben a NAP1 gátolja más importinok kötődését ezen hisztonok nukleáris import szignáljához [40].

A NAP1 fehérjéről kialakuló kép tehát azt mutatja, hogy a hiszton H2A és H2B fehérjék sejtmagba történő szállítását, nukleoszómába való beépülését, és a kromatinszerkezet aktív átalakulásait szabályozzák. Mindemellett a kromatinnal kölcsönhatva, mint szövetspecifikus faktoroknak, szerepük van a sejtosztódás és a génkifejeződés szabályzásában. Zlatanova és munkatársai a NAP1 fehérjéről írt összefoglaló cikkükben zsonglőr fehérjéknek nevezték el ezeket a proteineket, szemléltetve ezzel azt az

érdekességet, hogy a NAP1 fehérjék egyszerre több fajta funkció betöltésére is képesek [41].

### A növényi NAP1 fehérjék

Növényekben a NAP1 fehérjecsaládnak számos tagja van. Rizsben és dohányban cDNS hibridizációval azonosították a NAP1-hez közeli géneket. Ennek eredményeként két NAP1-szerű gént azonosítottak rizsben, és négyet dohányban [42]. Ezen gének mindegyike tartalmaz legalább egy lehetséges sejtmagi lokalizációs szignált. A rizs NAP1-szerű fehérjék elsősorban a gyökérben, a csúcsmerisztémában, és a fiatal virágban fejeződnek ki. A sejtosztódás folyamán mind a 4 dohány NAP1-szerű fehérje génje magas szinten kifejeződik [42]. A rizs és dohány NAP1-szerű fehérjék különböző affinitással kötődnek az egyes hiszton variánsokhoz *in vitro* [42]. A sejten belüli elhelyezkedés tekintetében is eltérő mintázatot mutattak ezek a fehérjék: a dohány NAP1;1 fehérje ingázik a citoplazma és a sejtmag között, a másik három dohány NAP1 protein ezzel szemben kizárólag a citoplazmában található [43]. Ezek a megállapítások arra utalnak, hogy a különböző növényi NAP1 fehérjék az emlősökhöz hasonlóan különböző funkciókat látnak el.

Szójában is azonosítottak egy NAP1 homológot kódoló cDNS-t, a SNAP1-et. [44] A SNAP1 is tartalmaz erősen savas doméneket, és egy lehetséges sejtmagi lokalizációs szignált. Kimutatták, hogy a SNAP1 is rendelkezik nukleoszóma összeszerelő aktivitással *in vitro* [44].

A lúdfű genom négy NAP1-hez igen közeli homológ gént tartalmaz. A velük végzett vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy mind a négy NAP1 fehérje elsősorban a citoplazmában található, és csak kis mértékben a sejtmagban [45]. Az At NAP1;4 különbözik a többitől abban, hogy ingázik a sejtmag és a citoplazma között, és szövetspecifikus kifejeződést mutat: csak bizonyos gyökérszegmensekben és pollenszemekben fordul elő [45]. A másik három At NAP1 fehérje általánosan előfordul a növényekben. Az At NAP1;3 a legnagyobb mennyiségben jelenlévő izoforma csíranövényekben [45]. Az *Atnap1;1-1 Atnap1;2-1 Atnap1;3-1* tripla mutánsok nem mutattak eltérő fenotípust a vad típusú növényekhez képest, habár közel 500 gén átíródása megváltozott bennük, és ezek a növények érzékenyek voltak UV-C sugárzás

okozta DNS károsodásra [45]. Az At NAP1;3 kötődik a kromatinhoz, méghozzá olyan géneknél dúsul fel, amelyek részt vesznek a DNS javításakor a nukleotidok kicserélésében. A nukleotid kicserélésben szerepet játszó gének kifejeződése kisebb mértékű a tripla mutáns növényekben [45].

Növényekben is ismerünk példát a NAP1 fehérjék sejtosztódásban betöltött szerepére. Az At NAP1;1 farnezilált formája a sejtmagban található, és serkenti a sejtosztódást a levélfejlődés sejtosztódási szakaszában [46]. Később az At NAP1;1 nem farnezilált formája a citoplazmában halmozódik fel, és a sejtek megnyúlását segíti elő. A nem farnezilált formában történő ektópikus termelése ennek a fehérjének megzavarta a szokásos levélfejlődést, és a sejtek megnyúlását eredményezte a sejtosztódási szakaszban [46].

A dohány NAP1 fehérjék mitózisban betöltött lehetséges szerepéről is vannak adatok: ezek a proteinek kölcsönhatnak tubulinnal, és egy dohányban előforduló mitotikus ciklinnel, a Nicta;CYCB1;1 molekulával [43].

A lúdfű NAP1 fehérjék részt vesznek a növények abszcizinsavra adott válaszában is. Az abszcizinsav növényi hormon a stressz adaptációban tölt be fontos szerepet. Az *Atnap1;3* mutáns alléliját hordozó növények kevésbé voltak érzékenyek abszcizinsavra, és csökkent sótoleranciát mutattak [47].

Összefoglalva az itt leírtakat elmondható, hogy a növényi NAP1 fehérjék sok tekintetben hasonlóan viselkednek állati rokonaikhoz: kötődnek hisztonokhoz, befolyásolják a sejtciklust és a transzkripciót, és néhány képviselőjük vándorol a citoplazma és a sejtmag között.

### **Az NRP proteinek állati homológjai emlősökben: a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje**

Az állati SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje széleskörűen előfordul eukariótákban, és erősen konzervált. Sokféle humán sejtvonalban kifejeződik, és elsősorban a sejtmagban található meg [48]. Rendelkezik egy C-terminális savas doménnel, amely a kromatinszerveződés szabályzásáért felelős [49], N-terminális szakasza pedig Protein Foszfataz 2A (PP2A) gátló hatásban játszik szerepet [50]. Humán sejtkultúrákban a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> szerin oldallánco(ko)n foszforilált [51] [52].

A SET elnevezés (SET = SE transzlokáció) onnan származik, hogy az SE nevű, akut differenciálatlan leukémiában szenvedő páciensből származó sejtvonalban azonosították először a fehérjét, mint a SET-CAN fúziós géntermék egyik alkotóelemét [51][53]. A CAN, vagy más néven NUP214 fehérje normálisan a sejtmaghártyában lokalizálódik, és feltehetően a sejtmag és a citoplazma közötti transzportban vesz részt. A SET-CAN kiméra fehérje a *can* gén 3' végének transzlokációjával jön létre [54]. Valószínűsítik, hogy ezen transzlokáció eredményeképpen alakul ki a betegeknél a leukémia [55].

Szarvasmarha veséből is azonosították a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjét, mint a Protein Foszfataz 2A enzim (PP2A) egyik hóstabil gátlóját [56][8]. Ekkor kapta az I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> elnevezést. Specifikusan gátolja ezt az enzimet, más típusú foszfatazok enzimaktivitását jelentősen nem befolyásolja [8]. Megállapították azt is, hogy a 25-119-ig terjedő aminosavak felelősek a PP2A-gátló hatásért [50].

A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje TAF-Ibeta néven is ismert. A TAF-I (Template-Activating Factor-I) fehérjét először HeLa sejtekben azonosították, az adenovírusok replikációjához szükséges gazdasejt faktorként [57]. A TAF-Ibeta a vírus DNS-éről történő átíródást is stimulálja azáltal, hogy módosítja az adenovírus-DNS és a hozzá kapcsolódó fehérjék kapcsolatát [58], [59]. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjével rokon NAP1 pedig képes átvenni annak szerepét az adenovírus replikációjának és transzkripciójának a serkentésében [60].

A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjének szerepe van a kromatinszerkezet átformálásával kapcsolatos szabályzó folyamatokban is. A pp32 fehérjével együtt tagja az ún. INHAT (*inhibitor of histone acetyltransferases*) komplexnek, amely erősen gátolja a p300 és a PCAF hiszton acetiltranszferáz enzimek aktivitását [4]. Az INHAT a hisztonokhoz kötődik, mintegy elfedve ezáltal őket az acetiltranszferáz enzimek elől. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> ily módon gátolja a hiszton acetilációt és a hiszton acetiltranszferázok aktivitásától függő kromatin fellazulást az átíródó DNS szakaszoknál.

Nem csak a hisztonok acetiláltsága, hanem a DNS metilációja is befolyásolja a gének átíródását. A metilált DNS a gének elhallgattatásával, a demetiláció az aktív transzkripcióval függ össze. Kromatin immunoprecipitálás során a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> a metilált DNS-sel tisztítódik együtt [61]. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> túltermelése továbbá gátolja a DNS demetilációját, és a transzkripció gátlását okozza [61]. A hisztonok acetiláltsága és a DNS

metiláció nem független egymástól: a hiszton acetiláció stimulálja a riporter plazmid demetilációját és átíródását *in vitro* humán sejtvonalban [61].

Mások azt is kimutatták, hogy a hisztonok közül legnagyobb affinitással a hiszton H3-mal hat kölcsön a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> [62], és gátolja a hisztonok véletlenszerű aggregációját [63]. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> elősegíti továbbá az Sp1 (Specificity Protein 1) és az ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) transzkripciós faktorok kötődését a DNS-hez [64] [65], valamint a *Xenopus laevis* sperma kromatin dekondenzációját [66]. A granzim-A molekulával kölcsönhatva pedig az oxidatív stressz okozta apoptózis szabályozásában is részt vesz [67]. A granzim-A egy szerin proteáz, amely a citotoxikus T limfocitákból szabadul fel [68], elhasítja a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjét, ezáltal felszabadul a gátlás alól egy DNáz, amely egyszálú hasításokat végez a DNS-en [5].

A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> kölcsönhat továbbá a KLF5 transzkripciós faktor DNS-kötő doménjével, megakadályozva ezzel a transzkripciós faktor kötődését a DNS-hez, és az általa közvetített transzkripciót [69]. A citokróm p450c17 fehérjével kölcsönhatva szerepet játszik a DHEA (dehidroepiandroszteron) hormon szintézisének szabályozásában [70]. A *Herpes simplex* vírus VP22 burokfehérjéjéhez is kötődik a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>, a kölcsönhatásnak a vírus-DNS szerveződésében lehet szerepe [71].

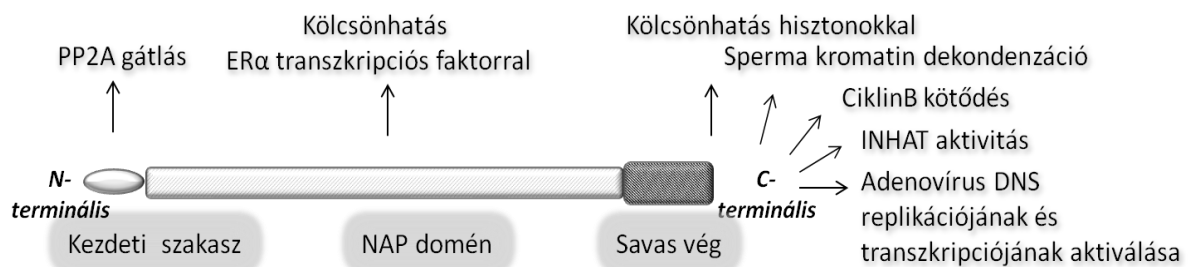
Patkányokon is végeztek kísérleteket a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjével kapcsolatban. A patkány veséjében a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> az egyedfejlődés során a fejlődő régiókban, a nefron morfogenezis zónájában fejeződik ki magas szinten [72]. Transzformált humán és rágszáló sejtvonalakban jóval magasabb az mRNS szintje, mint az olyan kultúrákban, ahol éheztetés vagy a kontakt gátlás miatt a sejtek nyugalomban vannak [72]. Ez a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> sejtproliferációban és tumorképződésben betöltött szerepére utal. Ki is mutatták a jelentőségét különböző típusú humán és patkány tumorok képződésében [72][73] [74] [75].

A tumorképződésben betöltött szerepével összhangban az is bebizonyosodott, hogy a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>, kölcsönhatva ciklinfüggő kinázokkal, ill. azok szabályzó faktoraival befolyásolja a sejtciklust, mind a G1/S, mind a G2/M átmenetekenél [76], [77], [37].

Megállapíthatjuk tehát, hogy a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje rendkívül sok funkciót lát el emlős sejtekben. Részt vesz a sejtosztódás, a transzkripció, és az apoptózis szabályozásában, befolyásolja a kromatinszerveződést, kölcsönhatást mutat zavarba ejtően sokfajta



fehérje faktorral, és mindemellett a Protein Foszfataz 2A gátlásában is szerepet játszik. Hogy ez az egyetlen fehérje hogyan lát el ennyi egymástól különböző, sőt bizonyos esetekben látszatra ellentétes funkciót (DNS javítás vs. apoptózis, génátíródás serkentése és gátlása), rejtély számunkra. Érdekes kérdés a jövőre nézve annak tisztázása, hogy milyen körülmények szükségesek a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> eltérő szerepeinek betöltéséhez. Ha a NAP1 fehérjékre zsonglőr fehérjeként gondolunk, akkor a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> egy még figyelemreméltóbb zsonglőr, hiszen még a NAP1 fehérjéknél is nagyobb számú és kiterjedtebb körű feladattal képes megbirkózni. A 3. ábrán feltűntettünk néhányat a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje által ellátott azon feladatok közül, amelyekről az is ismert, hogy melyik fehérjeszakasz felelős érte.

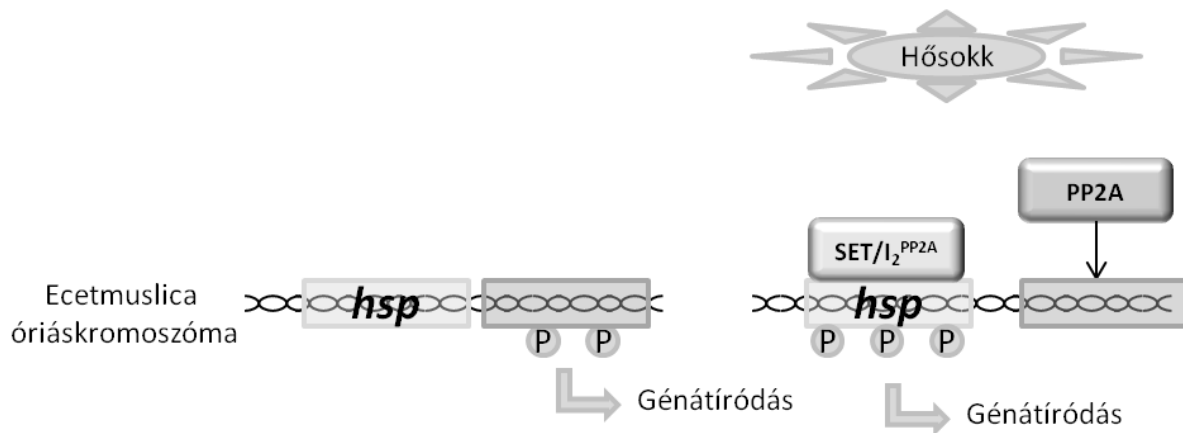


**3. ábra. A multifunkciós SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje különböző doménjei más és más funkciót látnak el emlős sejtekben.**

### A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> szerepe ecetmuslicában

Ecetmuslicán végzett kísérletek azt mutatták, hogy hő sok hatására az átíródó hő sokok géneknél a hiszton H3 foszforilált állapotba kerül, míg a represszált nem hő sokok géneknél a hiszton H3 defoszforilálódik [78]. Amikor egy specifikus Protein Foszfataz 2A gátló szert (okadainsavat) alkalmaztak a hő sokok kezelés mellett, a nem hő sokok gének helyén foszforilált maradt a hiszton H3 [78]. Ez a PP2A enzim szerepét bizonyítja a hiszton H3 *in vivo* defoszforilálásában. Erre utal az is, hogy a PP2A szabályzó alegységének génjébe beépült P elem hatására megnőtt a foszforilált hiszton H3 mennyisége a mutáns lárvákban. Megfigyelték továbbá azt is, hogy a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> a transzkripciósan aktív hő sokok gének helyén található meg az ecetmuslica nyálmirigyének óriáskromoszómáin hő sokot követően [78]. A *Drosophila* SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>

szerepe ebben a folyamatban nem tisztázott, a hőszokk génekhez kötődve feltehetően megakadályozza a hiszton H3 defoszforilációját, és/vagy serkenti a gének átíródását.



**4. ábra. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>, a PP2A, és a hiszton H3 foszforiláció viszonya hőszokkot követően ecetmuslicában (Nowak és munkatársai).**

Hőszokk hatására a korábban átíródó gének helyén a PP2A defoszforilálja a hiszton H3 molekulákat, ezzel egyidőben ezek a gének elcsendesednek. A hőszokk gének helyén (*hsp*) ezzel szemben aktív átíródás és a hiszton H3 foszforilációja tapasztalható. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje ezalatt a hőszokk génekhez kötődik [78].

**A lúdfű NRP fehérjék**

Amikor vizsgálatainkat megkezdtük az *Arabidopsis* NRP1 (At NRP1) fehérjével, nem volt semmilyen ismeretünk biológiai funkciójáról. Időközben több közlemény is napvilágot látott, amiben ezt a fehérjét jellemzik.

A két lúdfű NRP fehérje, az At NRP1, és az At NRP2 szerepet játszanak a gyökércsúcs sejtosztódásának fenntartásában [79]. Míg az *nrp1-1* és az *nrp2-1* mutáns növények fenotípusa megegyezik a vad típusú növényekével, addig az *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutánsok rövid gyökerekkel rendelkeznek [79]. Nem sokkal a csírázás után G2/M fázisban megrekedt sejtek halmozódnak fel ezeknek a mutáns növényeknek a gyökércsúcsában, ami aberráns gyökérnövekedéshez vezet. Ennek megfelelően a csírázást követő hatodik napig a dupla mutánsok normális gyökérnövekedést mutatnak,

a hetedik naptól kezdve azonban drasztikusan lassul a gyökérnövekedés [79]. A dupla mutáns növények többi szerve normális fejlődést mutat. [79]

Az *nrp1-1 nrp2-1* csíranövényekben közel 100 gén kifejeződése módosult a vad típusú növényekhez képest [79]. Ezek közé tartozik a GLABRA2, amely egy a gyökérszőr növekedés gátlásáért felelős transzkripciós faktor; és a PLETHORA2 transzkripciós faktor, ami pedig a gyökér nyugvó középpontjának kialakításában vesz részt [79]. Számos sejtfalban és az extracelluláris mátrixban előforduló fehérje génjének a kifejeződése is módosult a dupla mutánsokban. Ezek nem csupán szerkezeti elemek, hanem a gyökérszőrök sorsát meghatározó pozicionális információval is bírnak [79].

Megvizsgálták a DNS károsodás következményeit is a mutáns növényeken. A dupla mutáns növények genotoxikus stresszre (bleomicin kezelés) érzékenyebbek voltak, mint a vad típusú növények, és a PARP2 DNS javításában részt vevő polimerázt magasabb mennyiségben fejezték ki [79]. Érdekes módon azonban a DNS károsodás javításának sebessége megegyezett a dupla mutáns és a vad típusú növényekben. Ezért valószínű, hogy a dupla mutáns egyedek nem sérültek a DNS javítási folyamatokban, genomjuk azonban érzékenyebb lehet a DNS-t károsító hatásokra [79].

Az *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns növényekben sérült a szomatikus homológ rekombináció jelensége is [80]. Homológ rekombináció nem csak a meiózis alatt, az anyai és az apai kromoszómák közti kicserélődésekkor történik, hanem szomatikus sejtekben is előfordul a DNS károsodások javításakor [81]. A DNS javításához szükséges a nukleoszómák szétbontása, majd összeszerelődése, ezért fontos szerepet játszanak benne a hiszton chaperone-ok. Nem csak az NRP-mutánsok, hanem a három legáltalánosabban kifejeződő NAP1 fehérjében mutáns *nap1;1-1*, *nap1;2-1*, és *nap1;3-1*, valamint a tripla mutáns *nap1;1-1 nap1;2-1 nap1;3-2* lúdfű növények is csökkent homológ rekombinációs képességet mutattak [80]. Mutagén vegyszerek hatására is megvizsgálták a homológ rekombinációk előfordulását a növényekben. Ezeknek az ágenseknek a hatására jelentősen megnőtt a homológ rekombinációk száma a vizsgált levelekben, az *nrp1-1 nrp2-1* növényekben azonban jóval kevesebb volt detektálható, mint a vad típusú növényekben. Az *nrp1-1* szimpla mutánsokban ezzel szemben nem volt tapasztalható csökkent számú homológ rekombináció, sem standard körülmények

között, sem a genotoxikus stressz kezelések után. Ez a két NRP fehérje homológ rekombinációban betöltött redundáns szerepére utal [80].

---

## Célkitűzéseink

---

Vizsgálataink célja az volt, hogy a lúdfű NRP1 fehérjét funkcionálisan jellemezzük. Meg kívántuk határozni a szerin/treonin foszfatáz enzimekre gyakorolt hatását, a sejten belüli elhelyezkedését, a kölcsönható fehérjéket, a kifejeződésének paramétereit, és a túltermelődésének a hatásait, hogy ezáltal a sejtek életében betöltött szerepének megértéséhez közelebb kerüljünk. Mivel ecetmuslicában az At NRP proteinekkal nagyfokú homológiát mutató SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> szerepet játszik a hiszton H3 molekula defoszforilálásában hősokk folyamán, elsősorban arra voltunk kíváncsiak, vajon kölcsönhat-e az At NRP1 a hiszton H3 molekulával, és befolyásolja-e annak defoszforilálódását. Az At NRP1 hősokkválaszban betöltött esetleges szerepét is tisztázni kívántuk. Hogy teljesebb képet kapjunk az NRP fehérjék szerepéről, néhány kísérletünkbe bevontuk a lucerna NRP fehérje vizsgálatát is. Célkitűzéseink között szerepelt az is, hogy az *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns, ill. az AtNRP1-et túltermelő lúdfű növényeket jellemezzük.

---

## Anyagok és módszerek

---

### *In silico* szekvencia analízis

Az At NRP1 fehérjével homológ proteinek azonosítását Blast kereséssel végeztük ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)). A doménszerkezet megállapítását az InterPro adatbázis (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) biztosította. A sejtmagi export szignál helyének jóslását a NetNES ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/)) a sejtmagi lokalizációs szignál jóslását a cNLSMapper ([www.nls-mapper.iab.keio.ac.jp](http://www.nls-mapper.iab.keio.ac.jp)) program végezte. A többszörös szekvencia illesztést a ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program segítségével valósítottuk meg. Az aminosav szekvencia hasonlóságon alapuló filogenetikai fákat a Phylogeny.fr internetes oldalon szerkesztettük meg, a fa megjelenítése Drawgram programmal történt [21]. Az At NRP1 fehérje jóslott molekulásúlyát az ExPASy adatbázis (<http://www.expasy.org/>) szolgáltatta. A munkánk során felhasznált nukleinsav szekvenciák megtalálhatók a GeneBank/EMBL adatbázisokban, az alábbi nyilvántartási számokkal:

Medicago sativa NRP	FN552008
Arabidopsis thaliana NRP1	NM_001036205
Arabidopsis thaliana NRP2	NM_101738
Medicago sativa NAP1	XM_003595158
Arabidopsis thaliana NAP1.2	NM_001202624

### Növények

Kísérleteinkhez a következő lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) törzseket használtuk: vad típusú Columbia, NRP hiányos *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns, At NRP1-túltermelő, és a hozzá tartozó null szegregáns vonal.

Az *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns növényeket Dr Wen-Hui Shen (State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology, Fudan Egyetem, Shanghai, Kína) bocsátotta rendelkezésünkre. Ezt a törzset az *nrp1-1* és az *nrp2-1* T-DNS inszerciós mutagenézissel előállított mutáns vonalak keresztezésével állították elő. Az *nrp1-1* mutáns egy beépült T-DNS-t tartalmaz az NRP1 gén hatodik intronjában, az *nrp2-1* mutáns pedig az NRP2 gén promóter régiójában hordoz T-DNS-t. Zhu és munkatársai RT-PCR technikával ellenőrizték, hogy a dupla mutánsokban nem íródnak át az *nrp1* és *nrp2* gének [79].

Az *At* NRP1-túltermelő lúdfű magok a CROPDesign cég (Belgium) adományai voltak. A transzformált növények T2 generációjának egyedeit vizsgáltuk, kontroll növényként a transzgént nem tartalmazó szegregáns egyedeket használva. A transzformációs vektor a GFP (zölden fluoreszkáló protein) jelző gént, és a PPT (foszfinotricin) rezisztenciagént is hordozta, így a transzgenikus egyedek az utódpopulációkban könnyen azonosíthatóak voltak.

Columbia genotípusú növényekből létrehozott sejt szuszpenziót is használtunk kísérleteinkhez. A sejt szuszpenziókat hetente átoltottuk folyékony MS táptalajba, amely 30g/l szaharózt, 1mg/l Gamborg's B5 vitamint, 0.24 mg/l 2,4-D hormont, és 0.014 mg/l kinetint tartalmazott.

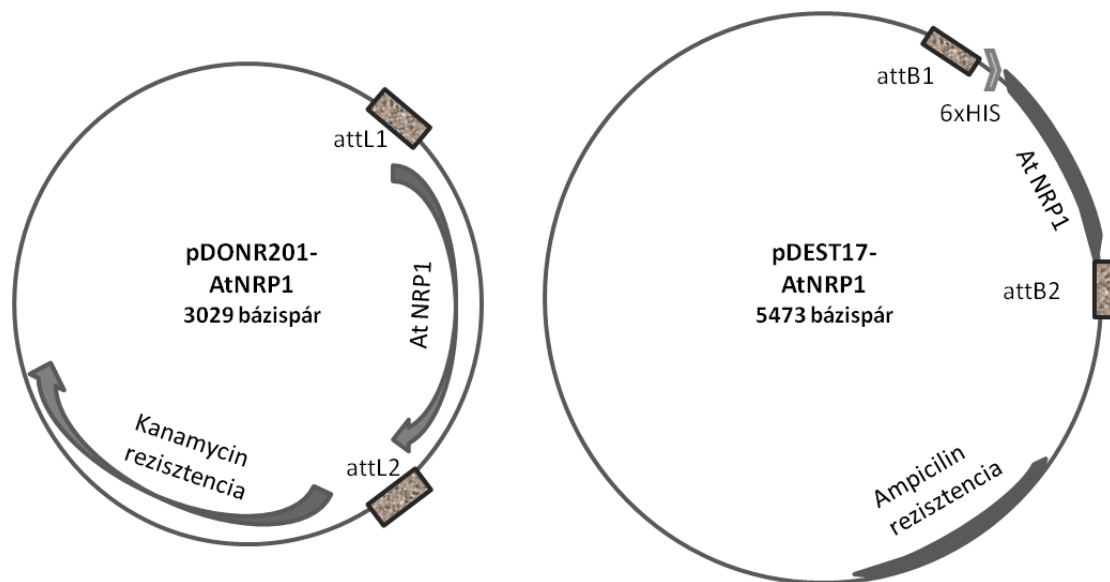
### A növények csíráztatása és a stresszkezelések

A lúdfű magok felületét sterilizáltuk 1 percig 70% etanol (v/v), majd 10 percig 30%-os higítású (v/v) háztartási hipoklorit oldattal, ezután ötször átmostuk steril vízzel, és steril Murashige és Skoog (MS) szilárd táptalajra (Duchefa Biochemie, B.V., Haarlem, Hollandia) hordtuk fel őket, amely tartalmazott 3% (m/v) szaharózt, 0.6% (m/v) agart, és a táptalaj pH 5.8-ra lett beállítva. A magokat 24°C-on csíráztattuk 8 óra világosság/16 óra sötétség ciklusok mellett.

A hő sokk kezelést vízfürdőben végeztük, a só-, genotoxikus-, és nehézfémstressz kezeléseknél a táptalajba kevertünk különböző koncentrációban NaCl-ot, bleomicint, ill. CdCl<sub>2</sub>-ot, az UV-kezelés során pedig UV-C fényt kibocsátó lámpával világítottuk meg a növényeket a későbbiekben leírt paraméterek mellett.

## A Gateway klónozás

A Gateway klónozás egy bakteriális rekombináción alapuló módszer, és az ún. att helyek közti rekombinációval valósul meg. Az Invitrogen cég LR clonase nevű enzimkeveréke az attL és az attB helyek közti rekombinációt végzi el. Ebben a reakcióban egy célvektor és egy kiindulási vektor vesz részt, az utóbbi tartalmazza a klónozni kívánt DNS szekvenciát az attL helyek között. A rekombináció következtében két új molekula jön létre: egy melléktermék, és az expressziós klón, amely tartalmazza a kívánt DNS fragmenst, valamint egy antibiotikum rezisztencia gént. Az 5. ábra a kiindulási vektor, és a létrejött expressziós plazmid egy-egy példáját mutatja.



**5. ábra. A genetikai manipulációk során használt plazmidok két példája: a pDONR201-AtNRP1, és a pDEST17-AtNRP1.**

A Gateway klónozáshoz használt kiindulási vektorban (pDONR201-AtNRP1) az *At nrp1* szekvenciáját az attL1 és attL2 helyek határolják. A klónozással létrehozott expressziós vektor (pDEST17-AtNRP1) 6xHis toldalékkal biztosítja az *At nrp1* átíródását *Escherichia coli* baktérium sejtekben.



## Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása

A pDONR201-AtNRP1, és a pDONR201-AtNAP1;2 plazmidok a CROPdesign cég adományai voltak. Ebből klónoztuk át az At NRP1 és az At NAP1;2 teljes cDNS szekvenciáját pDest17 vektorba, a Gateway (Invitrogen) technológia segítségével. A pDest17 plazmid indukálható promóterrel biztosítja a beiktatott gének átíródását 6xHis végződéssel. A gyökérgümő cDNS könyvtárból izolált *Medicago sativa* NRP cDNS-t az NcoI/XhoI hasítási helyek mentén kivágva a pENTRY4 Gateway vektorba illesztettük, majd a pDest17 bakteriális expressziós vektorba vittük át Gateway rekombinációval. A teljes hosszúságú lucerna NAP1 cDNS-t kutatócsoportunkban korábban *Medicago truncatula* gyökérgümő könyvtárból izolálták, és előbb pENTRY4, majd pDest17 vektorba illesztették. Az elkészült pDest17 konstrukciókat *Escherichia coli* Rosetta törzsbe transzformáltuk, és a baktériumsejteket szelektív Luria-Bertani (LB) táptalajon (10 g/l tripton, 5g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl) növesztettük. A felnövesztett, osztódó baktériumokhoz izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidot (IPTG) adtunk 1 mM végkoncentrációban, amely indukálja a pDest17 vektorról történő átíródást. Három óra inkubáció után a baktériumsejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd felvettük őket nátrium-foszfát pufferrben (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 2.5 mM  $\beta$ -merkaptoetanol). A sejteket ezután lizozim és szonikálás segítségével feltártuk, a sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk. A hisztidin véggel ellátott fehérjéket a felülúszóból affinitás kromatográfiával tisztítottuk hisztidint megkötő nikkeltartalmú gél segítségével (HIS-Select™ Sigma).

## Ellenanyagok termeltetése és tisztítása

A tisztított At NRP1 és Ms NRP fehérjéket nyulak immunizálására használtuk standard módszereket alkalmazva, hogy ellenanyagot nyerjünk belőlük. A nyúl szérumokon affinitás tisztítást hajtottunk végre az alábbiak szerint. Az antigénként használt rekombináns fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, átblottoltuk PVDF (polivinilidén-difluorid) membránra, tejporral blokkoltuk a membránt, majd hozzáadtuk a megfelelő szérumot. Négy óra inkubálás után a megkötődött ellenanyagokat glicin tartalmú savas (pH2.6) pufferrel eluáltuk, majd pH 8,0-as Tris pufferrel semlegesítettük.

A végső puffercserét és az ellenanyagok koncentrációjának növelését Microcon (Millipore) szűrőkön végeztük.

### Növényi fehérjék izolálása

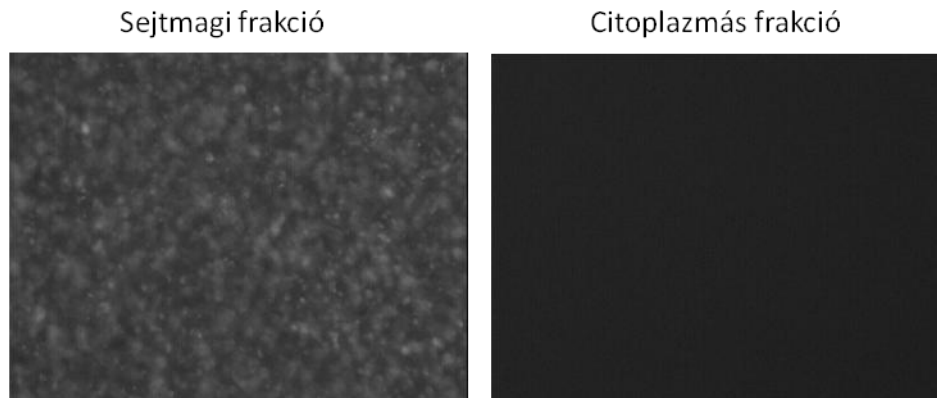
A folyékony nitrogénben fagyasztott növényi mintákat jégen eldörzsöltük kvarchomok és extrakciós puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM NaF, 60 mM β-glicero-foszfát, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid/PMSF, 2 mM ditiotreitól/DTT-t, és 10 µl/ml proteináz inhibitor koktél) jelenlétében. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagenssel, spektrofotométerrel határoztuk meg, 595 nm-en. Az immunoblot kísérletekhez mintánként 50 µg fehérjét használtunk fel.

Amikor hisztonok azonosítását kívántuk végezni immunoblot módszerrel, a fehérjék feltárását más módon végeztük. Erre azért volt szükség, mert a hisztonok erősen bázikus fehérjék, és a standard módszerrel nem biztos, hogy oldható formátumba kerülnek. Ilyen esetekben a növényi szöveteket folyékony nitrogénben dörzsöltük el mozsárban, és hiszton extrakciós pufferben (50mM Tris-HCL pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 1mM DTT, 10µl/ml proteáz inhibitor koktél, 50mM NaF, és 60 mM β-glicero-foszfát) vettük fel őket, majd a lizátumot tovább homogenizáltuk injekciós tű segítségével.

### Sejtek frakcionálása

A növényi mintákat folyékony nitrogénben eldörzsöltük mozsárban, majd feloldottuk sejtmag izoláló pufferben (1 M hexilén-glikol, 10 mM PIPES/KOH pH 7.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM DTT). A sejt lizátumot ezután átszűrtük négy réteg Miracloth szűrőn, és centrifugáltuk (2000 g, 10 perc, 4°C). Ezzel az enyhe centrifugálással leülepednek a sejtmagok. A felülúszót ezután tovább tisztítottuk centrifugálással (10000 g, 10 perc, 4 °C) a törmelékek eltávolítása érdekében, és az ezzel a lépéssel keletkező felülúszót használtuk citoplazmás frakcióként. A leülepített sejtmagokat pedig háromszor átmostuk mosó pufferrel (0.5 M hexilén-glikol, 10 mM PIPES/KOH pH 7.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM

DTT), ezután pedig sejtmagi frakcióként használtuk. A DNS-hez kötődő propídium-jodid festékekkel ellenőriztük a sejtmagi frakcióban feldúsult sejtmagok jelenlétét (6. ábra).



**6. ábra. A sejtfractionálással kapott sejtmagi és citoplazmás frakciók propídium-jodiddal festve.**

A hexilén-glikolt tartalmazó oldattal készített sejtmagi preparátumot, ill. a citoplazmát tartalmazó felülúszót a DNS-t megfestő propídium-jodiddal festettük, és fluoreszcens mikroszkóppal felvételt készítettünk.

### **Immunoblot (Fehérjék immunológiai detektálása)**

Az immunoblot technika alkalmas fehérjék azonosítására és mennyiségük meghatározására több fehérjét tartalmazó mintából. A kísérletek menete a következő volt:

A fehérje mintákat megforraltuk, hogy a polipeptid láncok disszociáljanak. Ezután SDS-poliakrilamid gélen futtatuk meg őket. Az SDS (szódium-dodecil-szulfát) egy erősen anionos detergens vegyület, amely kötődik a fehérjékhez, és egységes alakot, valamint negatív töltést kölcsönöz nekik. Ezért a fehérjék csupán méretük alapján szeparálódnak a gélben. Az elválasztás segítése érdekében kétféle gélfázist alkalmaztunk az elektroforézisnél: a fehérjék először a felső „összenyomó” gélbe jutnak (ebben a fehérjék egy vékony sávba koncentrálnak), majd az alsó szeparáló gélbe (ahol a fehérjék egymástól való elválasztása történik). A minták felvitele után 80V-os feszültségértéken végeztük az elválasztást kb. 3 óra hosszan. A futtatás végeztével a gélből a fehérjéket PVDF (polivinilidén-difluorid) membránra transzferáltuk (elektroblottoltuk), ahol

kovalensen kötődnek. A transzferálást 10V feszültségen 50 percig végeztük. A művelet eredményességét lemosható Ponceau festékekkel ellenőriztük.

Ezt követően 5% tejport és 0,05% Tween tartalmazó TBS pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) áztattuk a membránt, hogy azok a helyek is telítődjenek rajta, ahová nem kötődött protein korábban. Következő lépésként hozzáadtuk az elsődleges ellenanyagot (0,05% Tween és 5% tejport tartalmazó TBS pufferben). Négy fajta elsődleges ellenanyag fordult elő kísérleteinkben: az általunk előállított nyúl poliklonális lúdfű és lucerna NRP ellenanyagok, a PP2Ac-t felismerő nyúl poliklonális ellenanyag (Millipore), valamint a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> fehérjét felismerő nyúl poliklonális ellenanyag (Millipore). Az elsődleges ellenanyaggal történt inkubáció után a membránt mostuk 0,2% Tween tartalmazó TBS-pufferrel. Mosás után a membránt peroxidáz enzimmel kapcsolt másodlagos ellenanyag (nyúl immunglobulint felismerő ellenanyag, Sigma-Aldrich) tejporos oldatában inkubáltuk a gyártó által javasolt koncentrációban. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátját (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Applied Science) adtuk a membránhoz, amely egy kemilumineszcens vegyület és az enzim hatására fényt bocsát ki. A lumineszcenciát röntgen filmmel tettük láthatóvá.

### Foszfatáz aktivitás mérések

A Protein Foszfatáz 1 (PP1) és a Protein Foszfatáz 2A (PP2A) katalitikus alegységeit nyúl vázizomból Dr Erdődi Ferenc és Dr. Kiss Andrea izolálták [82]. Dr. Dombrádi Viktor és munkatársai (Debreceni Orvostudományi Egyetem Vegytani Intézete) a vizsgálatokhoz kétféle radioaktív foszforral (<sup>32</sup>P) jelzett szubsztrátot készítettek. A glikogén foszforiláz szubsztrátba foszforiláz kinázzal, a hiszton H2A fehérjébe protein kináz A segítségével építették be a radioaktív foszfátcsoportokat. A proteinekből kihaladó <sup>32</sup>P<sub>i</sub>-t Cserenkov sugárzással mérték [83].

A lúdfű PP2A aktivitásának vizsgálatához foszfát puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0 kiegészítve 100 μM CaCl<sub>2</sub>-dal) jelenlétében immunoprecipitáltuk az enzimet monoklonális PP2Ac ellenanyaggal (Cell Signalling Technologies). A foszfohiszton szubsztrát humán hiszton H3.1 (New England Biolabs) foszforilálásával készült, protein kináz A (New England Biolabs) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. A

foszfatáz reakciót 30 percig hagytuk kifejlődni, a tisztított 6xHis végződésű NRP, NAP, vagy ROP6 fehérjék jelenlétében, vagy azok nélkül. A foszfohiszton szint csökkenését immunoblottal detektáltuk hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> specifikus ellenanyaggal (Millipore).

### **Ko-immunoprecipitálás**

A PP2A immunoprecipitálásakor a növényi szöveteket folyékony nitrogénben dörzsöltük el, majd foszfatáz extrakciós pufferben vettük fel őket (20 mM imidazol, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, és 10 µl/ml proteínáz inhibitor koktél, pH 7.0). A hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> immunoprecipitálásakor kromatint izoláltunk. Ehhez a növényi szöveteket folyékony nitrogénben dörzsöltük el mozsárban, és sejtmag extrakciós pufferben (0.4 M szaharóz, 10 mM HEPES, pH 8, 2.5 mM DTT, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 10µl/ml Sigma-Aldrich proteáz inhibitor koktél, 50mM NaF) vettük fel őket, majd a lizátumot átszűrtük 2 réteg Miraclonon. Centrifugálás (3000g, 10 perc, 4°C) után a csapadékot 1% TritonX-100 tartalmú sejtmag extrakciós pufferben vettük fel. Újabb centrifugálás (10000g, 10 perc, 4°C) után a csapadékot 300 µl 1,7 M szaharóz tartalmú oldatban (1,7 M szaharóz, 10 mM HEPES, pH 8, 0.15% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10µl/ml Sigma-Aldrich proteáz inhibitor koktél) vettük fel, rárétegeztük ugyanezen pufferre, majd centrifugálással üleptítettük a kromatint. Az immunoprecipitáláshoz egyforma mennyiségű extraktumokat inkubáltunk a megfelelő ellenanyaggal, ill. ellenanyag nélkül (negatív kontroll). Az ellenanyag-antigén komplexeket Protein A-agaróz segítségével tisztítottuk.

### **Kromatin immunoprecipitációs esszé (ChIP)**

A hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> foszforilációval jelölt kromatin izolálásához dr. Domoki Mónika kromatin immunoprecipitációs esszét hajtott végre az alábbi procedúra szerint. Három hetes csíranövényeket 1% formaldehid jelenlétében 10 percig vákuum infiltráltunk, majd a reakciót 0,125 M végkoncentrációban hozzáadott glicinnel állítotuk le. A keresztkötött növényi mintákat folyékony nitrogén jelenlétében eldörzsöltük, kromatint izoláltunk az előző részben leírt módon, majd szonikáltuk a mintákat annak érdekében,

hogy közel 500 bázispár méretű DNS fragmenteket kapjunk. A szonikálás sikerességét etídium-bromid-gélelektroforézissel ellenőriztük. A kromatint tartalmazó oldatot előtisztítottuk hering sperma DNS-sel telített Protein A-agaróz gyöngyökkel (100 µl Sigma-Aldrich protein A agaróz / 40 µg fragmentált hering sperma DNS). Az immunoprecipitálást hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-felismerő ellenanyaggal (Upstate Biotechnology) végeztük. Az immunoprecipitált komplexekben feloldottuk a keresztkötődést 200 mM végkoncentrációjú NaCl hozzáadásával (65°C-on 6 órán át). Ezután proteináz K kezelést alkalmaztunk (150 µg/ml, 1 órán át), majd DNS-t izoláltunk fenol-kloroform extrakcióval és etanolos kicsapással. A promóter szekvenciák azonosítását az immunoprecipitált kromatin frakcióban PCR-rel végeztük, az alábbi primerek felhasználásával:

Név	TAIR kód	5'-3' szekvencia
HSP18.2 promoter 5'	At5g59720	AACGTGGCTCAGTTCTTG
HSP18.2 promoter 3'		CCTTCGCTTGGAGTCTTTAG
HSP20-like promoter 5'	At4g21870	CGGTACTGCAAATTTTCCTC
HSP20-like promoter 3'		ATCCAACAATTGTGTCGACTC
HSP70.1 promoter 5'	At3g12580	GCGAGGAGTCATTCTAGTTC
HSP70.1 promoter 3'		TTCTAGCTCCTTCGAGATGG
HSP100 promoter 5'	At5g15450	TCCGTGGTTAACAATGTTTG
HSP100 promoter 3'		ATCAGCAAAGAGAAACGCTTTTGC

### Lúdfű protoplastok transzformálása

A lúdfű protoplastok előállításához 3-4 napos sejtszuszpenziót gyűjtöttünk be, és a sejteket üleptettük centrifugálással. A sejteket ezután felvettük 1% cellulázt és 0,2% macerozimot tartalmazó B5-GM tápoldatba (B5 por a gyártó utasítása szerint, 30,5 m/v % glükóz, 30,5 m/v % mannitol, pH 5,5), és sötétben emésztettük őket 3-4 órán át. Ha a sejtfaluk megemésztődött, átmostuk őket B5 GM oldattal, majd B5-S oldatba (B5 por a gyártó utasítása szerint, 0,28M szacharóz, pH 5,5) vettük fel őket. Ebben a sűrű oldatban

az ép protoplasztok a centrifugálás hatására felúsznak a felszínre, ahonnan pipettával összegyűjthetőek. A felúszott protoplasztokat Bürker kamrában megszámoltuk. Mintánként  $5 \times 10^5$  számú protoplasztot használtunk, amelyet 50  $\mu$ l B5 GM tápoldatban vettünk fel. Ehhez adtunk 10-15  $\mu$ g-ot a GFP-vel kapcsolt *at nrp1* gént hordozó plazmidból, és 150  $\mu$ l polietilén-glikol (PEG) oldatot (25% PEG 6000, 0,45M mannitol, 0,1M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , pH 9,0), majd 15-20 perc inkubálás következett sötétben. A PEG egy nagy molekulatömegű, ozmotikusan igen aktív anyag, amely a sejthártyán pórusokat képez. Jelenlétében a sejtek vizet vesztenek, és összezsugorodnak. Az inkubációs idő letelte után felhígítottuk a közeget mosóoldattal (0,275 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ). Ekkor történik a génbevitel; az ozmózis iránya ugyanis megfordul, és a beáramló vízzel együtt a képződő pórusokon a DNS is a sejtekbe jut. Mosás után a protoplasztokat B5-GMtápoldatban inkubáltuk sötétben 14-16 órát, majd mikroszkóppal megvizsgáltuk őket. Ezzel a módszerrel a zölden fluoreszkáló fehérjét is kifejező kiméra gének expressziója néhány napig figyelhető meg (tranzienst génkifejeződés).

A tranzienst génkifejeződéshez használt plazmid előállításához dr Szűcs Attila a pK7FW62 vektort [84] emésztette *Hind*III és *Xba*I restrikciós endonukleázokkal, majd a keletkező fragmentet az ugyanezen enzimekkel emésztett pBSK vektorba illesztette. Az így létrejött pBSK-GFP-GW vektorba LR klonáz (Invitrogen) segítségével illesztettük be az *at nrp1* kódoló szakaszát.

## Immunhisztokémia

A sejtuszpenzióból vett sejteket protoplasztáltuk erős enzimoldattal (3% Cellulase RS, 1% Cellulase R-10, 1% Macerozyme R-10, 0,5M mannitol, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 5,3) majd fixáltuk 6% formaldehiddel. Ezt követően poli-L-lizines tárgylemezen rögzítettük a sejteket. A sejteket rehidratáltuk 0,05% Triton X100-zal, és mostuk PBS pufferrel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , pH 7,4) Elsődleges ellenanyagként az NRP fehérjét felismerő nyúl immunglobulint használtunk (200-szoros hígításban, 50  $\mu$ l PBS pufferben lemezenként). Az ellenanyaggal történt inkubálás után PBS-sel mostuk a tárgylemezt, majd a FITC-szel (fluoreszcein izotiocianát) kapcsolt másodlagos ellenanyagot adtuk hozzá (A Sigma cég FITC-cel kapcsolt nyúl ellenes immunglobulinját

használtuk, 100-szoros hígításban). Inkubálás és mosás után DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, 0.02 µg/µl) festést is alkalmaztunk, amely a sejtmagot festi meg, és UV fényben gerjeszhető. A felvételeket Olympus FV 1000 pásztázó lézer konfokális mikroszkóppal készítettük

### Fluoreszcencia kiégetés (FLIP)

A fluoreszcencia kiégetés (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) kísérleteknél egy 2 µm átmérőjű pontot ismételten kiégettünk 488 nm hullámhosszú lézer segítségével, a lézer erejének 80%-os kihasználtsága mellett. Minden egyes kiégetés után, 1.5 másodpercenként felvételt készítettünk a lézer erejének csökkentésével. A kiégetések 500 ms időtartamúak voltak. A számításokhoz egy 2 µm átmérőjű kör intenzitását vettük alapul, 10 µm-re a kiégetés helyétől a sejtmagon belül. Öt különböző sejt felvételeiből származó átlagokat ábrázoltunk. A fluoreszcencia intenzitás értékeket a totál fluoreszcencia változására normalizáltuk az alábbi képlet szerint:  $I_{rel} = (T_0 I_t) / (T_t I_0)$ , ahol  $T_0$  a totál sejtbeli intenzitás kiégetés előtt,  $T_t$  a totál sejtbeli intenzitás  $t$  időpontban,  $I_0$  a kijelölt hely átlagos intenzitása kiégetés előtt,  $I_t$  pedig a kijelölt hely átlagos intenzitása  $t$  időpontban. A felvételeket Olympus FV 1000 pásztázó lézer konfokális mikroszkóppal készítettük

### RNS tisztítás, cDNS szintézis

A növényi mintákból totál RNS-t izoláltunk TRI reagens (RNAzol®, Sigma-Aldrich) felhasználásával. A TRI reagens fenolt és guanidin-tiocianátot tartalmazó oldat, amely gátolja az RNázok aktivitását. A mintákat eldörzsöltük folyékony nitrogénben mozsár segítségével, majd TRI reagensben vettük fel őket. Kloroform hozzáadása után a mintákat vizes és szerves fázisra választottuk szét centrifugálással. Ekkor az RNS a vizes fázisban található, míg a DNS és a fehérjék az interfázisban, ill. a szerves fázisban. Az RNS-t ezután izopropanollal csaptuk ki az összegyűjtött vizes fázisból, majd mostuk etanollal, végül feloldottuk RNáz inhibitorot tartalmazó vízben.



A totál RNS-ek 2 µg-jából szintetizáltunk cDNS-t oligo(dT) primerek, és RevertAid H minus M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas) enzim felhasználásával, a gyártó előírásai alapján.

### Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

A valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR) kísérleteinkhez az Applied Biosystems cég ABI PRISM 7700 készülékét használtuk. Ez a technika abban különbözik a hagyományos PCR-től, hogy egy fluoreszcens festék és egy kamera segítségével a szintetizálódó DNS mennyiségét a reakció során folyamatosan nyomon követhetjük. Többféle fluoreszcens jelölés alkalmazható, mi a SYBR green festéket használtuk, amely specifikusan a duplaszálú DNS-hez kötődik, és kötődött formában erősen fluoreszkál. Mivel azonban ez a festék nem tesz különbséget a DNS szekvenciák között, a termék mellett esetlegesen képződő más duplaszálú DNS-eket – szennyeződést, a primer rossz helyre bekötődéséből származó termékeket, vagy az egymáshoz kötődő primerek által képződő duplaszálú DNS-t – is detektálhatunk vele. Emiatt a keletkező termékeket disszociációs hőmérsékletük alapján ellenőriztük. Néhány kísérletben a specifikus, ún. TaqMan próba megközelítést alkalmaztuk. Ehhez „Universal ProbeLibrary” (Roche Applied Science) technológiát használtuk, amely egy 8-9 nukleotid hosszúságú próbákból álló oligonukleotid könyvtáron alapul. A próbák 5' végükön fluoreszcein festékekkel vannak jelölve, 3' végükön pedig egy emissziót kioltó molekulát tartalmaznak. A próbát minden megsokszorozni kívánt termék esetében úgy választjuk ki, hogy az amplifikálni kívánt régióhoz specifikusan kötődjön. Ahogy a Taq polimeráz megkezdte a primerek elongációját, exonukleáz aktivitásának köszönhetően elbontja a templáthoz kötődött próbát. Így elszabadul a fluoreszcein a kioltó molekula közelségéből, és fluoreszkálni kezd.

96 csövet tartalmazó mintatartókat használtunk, ami egyszerre sok minta vizsgálatát tette lehetővé. Minden cDNS mintát három ismétlésben vittünk fel, és a belőlük kapott értékeket a kiértékelés során átlagoltuk, ami a pipettázási hibák kiküszöbölése miatt fontos. Templátként cDNS-t használtunk, ezért az eredményekből az mRNS-szintről kaptunk információt. A kiértékelés szempontjából a reakció lineáris része érdekelt

bennünket, itt húzzuk meg a küszöbértéket. Azt a pontot, ahol a fluoreszcencia metszi a küszöbértéket, azaz azt a ciklusszámot, ami a küszöbfluoreszcencia eléréséhez kell,  $C_T$ -nek nevezzük. Minél hígabb a minta, annál későbbi ciklusszámnál éri el a fluoreszcenciája a küszöböt. Ily módon a valós idejű PCR relatív kvantitálásra is alkalmas [85]. Ehhez azonban egy belső kontroll gén használata is szükséges, amelyről feltételezhető, hogy a kísérleti körülmények között nem változik a kifejeződése. A Genevestigator internetes adatbázisban (<https://www.genevestigator.com/>) kerestünk erre a célra megfelelő géneket. Választásunk az Arabidopsis UBC18 ubiquitin-konjugáló enzimet kódoló génjére (At5g42990) esett. További kontrollként egy olyan referencia gént is használtunk, amely a hősokk fehérje génekkel rokon, de kifejeződése hősokk alatt állandó marad (At HSP20-like, At4g21870).

A valós idejű PCR kísérletekben az alábbi primerpárokat használtuk:

Név	TAIR kód	5'-3' szekvencia
AtHSP18.2 5'	At5g59720	TTTACAAACGCAAGAGTGGA
AtHSP18.2 3'		CCTTGACTTCTTCCTTCTTCAG
AtHSP20-like 5'	At4g21870	GGTCTCAGTCTCCAGATTCTC
AtHSP20-like 3'		AAAGTCTTCAAAGGCTGATCC
AtHSP70.1 5'	At3g12580	GAATCAAGTCGCCATGAACC
AtHSP70.1 3'		GACTCTTATCCGCTTGAACAG
AtHSP100 5'	At5g15450	GGAAAGGTATGAACTACATCATGG
AtHSP100 3'		ACCAAGTCAATTGCTTTATCGG
AtUBC18 5'	At5g42990	ACAGCAATGGACATATTTGTTTAGA
AtUBC18 3'		TGATGCAGACTGAACTCACTGTC

### Növénysejtek túlélésének vizsgálata

Egy hetes lúdfű csíranövények klorofill fluoreszcencia intenzitását mértük hősokk kezelés nélkül, valamint 1, 2, és 3 nappal a hősokk kezelést (1h 45°C) követően.

Floureszcens sztereo mikroszkóp segítségével, kék fénnel gerjesztve felvételt készítettünk a klorofill pigment autofluoreszcenciájáról. ImageJ szoftverrel (National Institute of Health, Anglia) analizáltuk a képeket: egyforma nagyságú területeket kijelölve minden egyes fotón kiszámítottuk az arra a területre eső pixel intenzitások átlagát.

Másik módszert alkalmazva protoplasztokat izoláltunk At NRP1-túltermelő, és null szegregáns növényekből. A protoplasztokat 45°C-on hőkezeltük vízfürdőben, majd Evans Kék festékkel festettük őket meg, és Nikon TE-300 mikroszkóppal felvételeket készítettünk róluk. A festődött és nem festődött protoplasztokat megszámloltuk az ImageJ szoftver (National Institute of Health, Anglia) Cell Counter eszközének segítségével.

---

## Eredmények

---

### A lúdfű NRP fehérjék detektálása 37 kDa molekulásúly magasságában SDS-poliakrilamid gélben

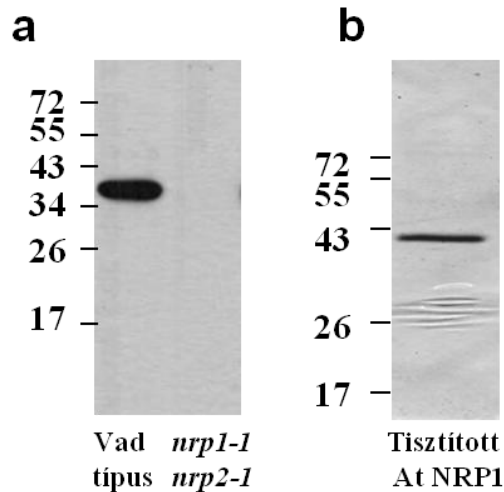
A 256 aminosav hosszúságú *Arabidopsis* NRP1 (At NRP1) fehérje kalkulált molekulásúlya az internetes ExpASy (Swiss Institute of Bioinformatics) adatbázis szerint 29,4 kDa. Ezzel ellentmondó volt az általunk immunoblottal észlelt 37 kDa környékén látható jel, amelyet az At NRP1 fehérje ellen nyúlban termeltetett, és affinitástisztított ellenanyagunkkal detektáltunk (7. ábra). Ez az ellenanyag vélhetőleg felismeri mindkét lúdfű NRP fehérjét (NRP1 és NRP2), - mivel a két fehérje nagyfokú egyezést mutat-, ezért az ezzel az ellenanyaggal detektált fehérjéket általánosan NRP-nek jelölöm.

Hogy az NRP ellenanyagunk a megfelelő fehérjéket detektálja, azt bizonyítja az ábrán látható immunoblot tesztünk, ahol a T-DNS beépüléssel előállított *nrp1-1 nrp2-1* lúdfű mutánsokból származó fehérjekivonatban hiányzik az NRP ellenanyag által felismert sáv.

Hasonlóan, az *E. coli* baktériumban termeltetett és tisztított At NRP1 is jóval magasabb molekulásúly tartományban jelentkezett a szódium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélben, Comassie Brilliant Blue festékekkel festve. A 6 hisztidin aminosavval megtöltött (6xHis), tisztított At NRP1 41 kDa környékén vándorol a denaturáló gélben, elektroforézis során. A 41 és a 37 kDa közötti eltérést a 6xHis toldalék miatti méretbeli különbség okozhatja.

A fehérjék vándorlása az SDS-poliakrilamid gélben azok hosszától és töltésétől függ. Az At NRP1 fehérje lassabb vándorlását a benne nagy számban előforduló savas aminosavak okozzák: a negatív töltésű SDS ugyanis taszítja a savas oldalláncokat, ami szokatlan tömeg-töltés arányhoz vezet. A savas bázisú fehérjék emiatt lassabban vándorolnak az SDS-poliakrilamid gélben.

Ez magyarázhatja azt, hogy az NRP fehérjék humán homológja, a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> protein esetén is leírtak hasonló jelenséget: a 32 kDa nagyságúnak jóslott fehérje 39 kDa magasságban detektálható az SDS-poliakrilamid gélben [51]



#### 7. ábra. A lúdfű NRP fehérjék detektálása SDS-poliakrilamid gélben.

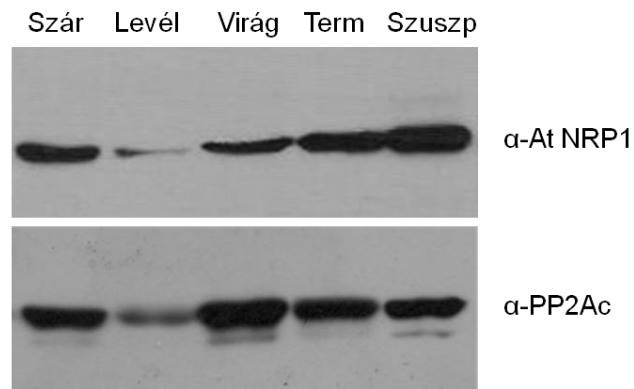
**a.** Az At NRP1 elleni ellenanyag egy 37 kDa körüli fehérjét ismer fel vad típusú növényekből származó fehérje kivonatból, ami hiányzik az NRP hiányos *nrp1-1 nrp2-1* mutánsokból.

**b.** A tisztított 6xHis-NRP1 hasonló mérettartományban (~41kDa) vándorol a denaturáló poliakrilamid gélben.

#### A lúdfű NRP fehérjék kifejeződése különböző szövetekben

A növényi NRP fehérjék jellemzése során először megvizsgáltuk, milyen szövetekben fordulnak elő. Az általunk vizsgált lúdfű növényi részek (szár, rozetta levél, virág, éretlen termés, és sejt szuszpenzió) mindegyikében jelen voltak az NRP proteinek (8. ábra). Mivel azonban a különböző szövetekben eltérő mennyiségben voltak jelen, további kísérleteinkhez egész csíranövényeket használtunk, ill. sejt szuszpenziót, amely sejtekben nagy mennyiségben termelődnek NRP fehérjék.

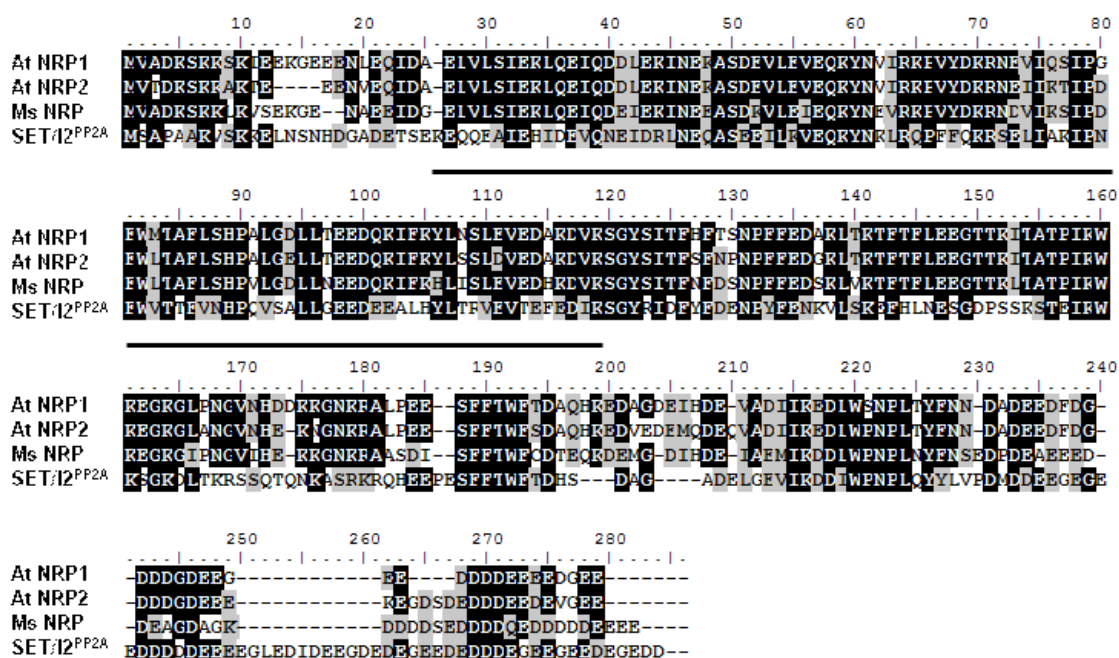
Mivel az At NRP1 állati homológjairól tudtuk, hogy Protein Foszfataz 2A (PP2A) gátló hatásuk van, megvizsgáltuk ezen enzim előfordulását is az előbbi lúdfű szövetekben. A PP2A katalitikus alegységének kifejeződése hasonló mintázatot mutatott az NRP fehérjékével.



**8. ábra. Az Arabidopsis NRP és PP2A fehérjék szövetspecifikus kifejeződése**  
Immunoblot kísérletet végeztünk különböző növényi részek felhasználásával, sorrendben: szár, rozetta levél, virág, éretlen termés, és sejt szuszpenzió. Az SDS-poliakrilamid gélen mindegyik fehérje preparátumból 50 µg mennyiséget futtattunk meg, majd lúdfű NRP1, ill PP2A katalitikus alegységet (PP2Ac) felismerő ellenanyaggal detektáltuk a megfelelő fehérjéket.

### A növényi NRP fehérjék gátolják a PP2A és a PP1 enzimeket *in vitro*

Az NRP fehérjék állati homológja (SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>) ismert Protein Foszfataz 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) gátló [56]. Deléciós mutánsok segítségével kimutatták, hogy a PP2A-gátláshoz elengedhetetlen a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> 25-119-ig terjedő aminosav szekvenciája [50]. Mivel ez a régió 75-77%-os hasonlóságot mutat a lúdfű és lucerna növények azonos helyen lévő aminosav szekvenciájával (9. ábra), kézenfekvő volt megvizsgálni a növényi NRP fehérjék esetleges foszfataz gátló tulajdonságát.



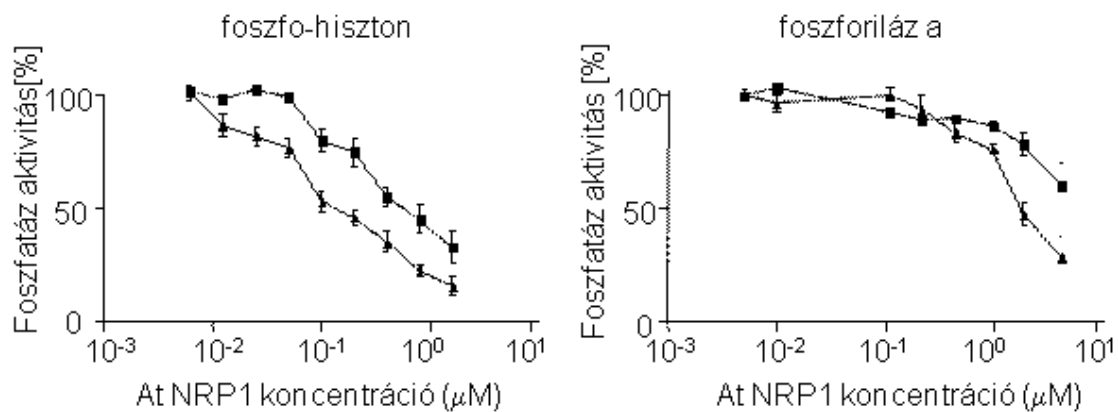
### 9. ábra. A növényi NRP fehérjék és a humán SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjék aminosav szekvencia hasonlósága

Szekvencia illesztést végeztünk két lúdfű, egy lucerna, és egy humán gén felhasználásával, sorrendben (GeneBank azonosító számokkal): AtNRP1 (Q9CA59), AtNRP2 (Q8GXV1), Ms NRP (CBE70787), és SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> (Q01105). A foszfatáz gátló hatásért felelős régiót aláhúzás jelöli.

Növényekben a szerin/treonin foszfatázoknak két csoportja ismert: a PP1 és a PP2A [86]. Ezen enzimek katalitikus alegységéhez többféle szabályzó alegység kapcsolódhat, megszabva a katalitikus alegységek specifitását [87] [88].

Elsőként nyúl vázizomból izolált PP1 és PP2A foszfatázok katalitikus alegységeivel (PP1<sub>c</sub> és PP2A<sub>c</sub>) végeztük el a kísérleteket, ugyanis ezek a foszfatázok evolúciósan rendkívül konzerváltak [89]. A foszfatáz aktivitást foszforiláz a és foszfohiszton szubsztrátok segítségével mértük meg. A rekombináns lúdfű NRP1 (At NRP1) fehérje mindkét vizsgált szubsztrát esetén dóziszfüggő módon gátolta mind a PP1, mind a PP2A katalitikus alegységeinek aktivitását (10. ábra). Specifitás szempontjából mindazonáltal jelentős különbség mutatkozott. Az 50%-os gátláshoz szükséges At NRP1-koncentráció (IC<sub>50</sub>) értéke foszfohiszton szubsztrát esetén 0,58 μM volt PP1<sub>c</sub> molekulánál, míg csupán 0,14

$\mu\text{M}$  PP2A<sub>c</sub> esetén. Ugyanezen értékek foszforiláz a szubsztrát alkalmazásakor jóval magasabbak voltak: az 50%-os gátlás eléréséhez 4,1  $\mu\text{M}$  tisztított At NRP1 fehérjére volt szükség PP1<sub>c</sub> esetén, míg 1,71  $\mu\text{M}$  elegendő volt PP2A<sub>c</sub> molekula esetén. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy az *Arabidopsis* NRP1 fehérje is *in vitro* foszfatáz gátló tulajdonsággal bír, és nagyobb affinitással gátolja a PP2A enzimet a PP1 foszfatázzal szemben. Mindemellett az is kitűnik vizsgálatainkból, hogy az At NRP1 foszfatázgátló hatása szubsztrátspecifikus.

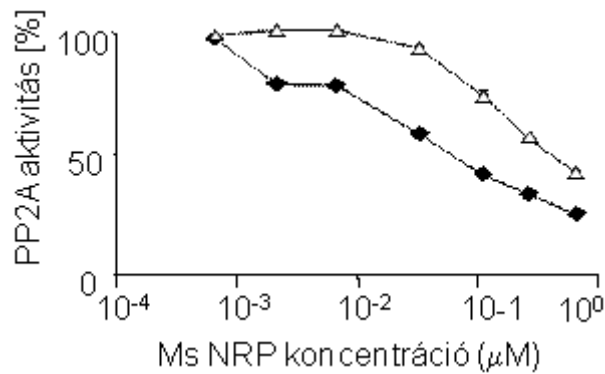


#### 10. ábra. A lúdfű NRP1 gátolja a Protein Foszfatazókat *in vitro*

A tisztított At NRP1 hatását vizsgáltuk nyúl vázizomból preparált PP1 (■) és PP2A (▲) foszfatázok katalitikus alegységének aktivitásán. Szubsztrátként foszforilált hisztont (balra), vagy foszforiláz a molekulát (jobbra) használtunk. 100%-nak vettük a rekombináns At NRP1 nélkül mért foszfatáz aktivitásokat. Az ábra három független kísérlet átlagát és szórásait mutatja.

Hasonló eredményeket kaptunk tisztított *Medicago sativa* NRP (Ms NRP) fehérjével is (11. ábra), ami arra utal, hogy a foszfatáz gátlás általánosan előforduló jellegzetessége a növényi NRP fehérjéknek.



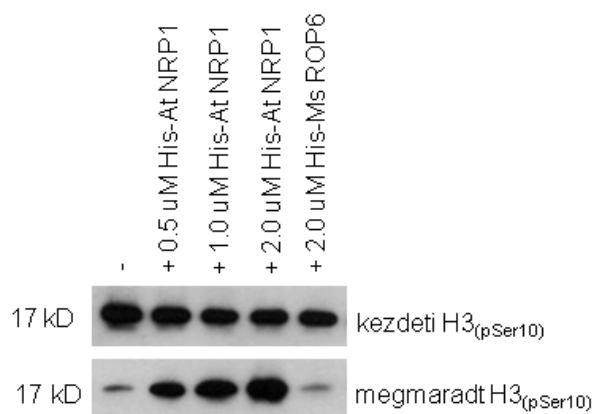


### 11. ábra. A lucerna NRP gátolja a PP2A aktivitását

A nyúl vázizomból preparált PP2A katalitikus alegységének aktivitását Ms NRP jelenlétében foszforilált hiszton (◆), vagy foszforiláz a (Δ) szubsztrát hozzáadásával mértük. 100%-nak vettük a rekombináns Ms NRP nélkül mért foszfatáz aktivitásokat. Az ábra két független kísérlet átlagát mutatja.

### *Az Arabidopsis thaliana NRP1 fehérje gátolja a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> At PP2A által végzett defoszforilációját in vitro*

Az ecetmuslica NRP-homológáról is kimutatták PP2A gátló hatását, és szabályzó szerepét a hiszton H3 molekula 10. aminosavjának (Ser10) defoszforilálódásában. Ezért mi is teszteltük az At NRP1 fehérjének az immunoprecipitált lúdfű PP2A enzimre gyakorolt hatását, a 10. szerinen foszforilált hiszton H3 (hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>) molekulát használva szubsztrátként. A tisztított, hisztidin toldalékkal ellátott At NRP1 fehérjét növekvő koncentrációban alkalmaztuk a foszfatáz reakcióban, a foszforilált hiszton H3 mennyiségét pedig immunoblot módszerrel detektáltuk, hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-et felismerő ellenanyag segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy a lúdfű növényből származó PP2A is defoszforilálta a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-et, az At NRP1 pedig dózisfüggő módon gátolta ezt (12. ábra). Kísérleteinkben negatív kontrollként hisztidin véggel tisztított Ms ROP6 fehérjét [90] alkalmaztunk, amely nem volt hatással a foszfatáz reakcióra.

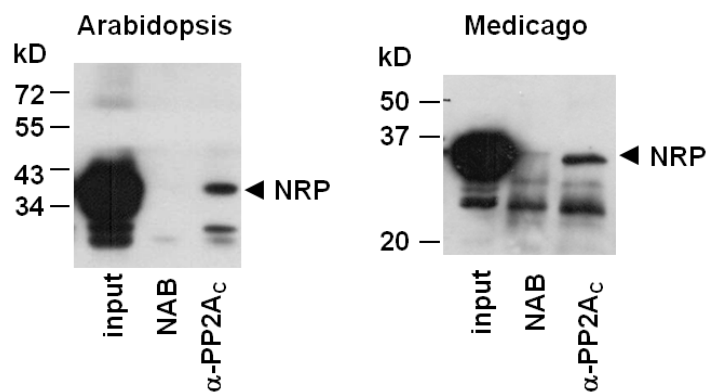


### 12. ábra. A lúdfű NRP1 gátolja a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> defoszforilációját

Az immunoprecipitált lúdfű PP2A aktivitását 0,5-2  $\mu$ M 6xHis toldalékkal ellátott tisztított At NRP1, vagy 2  $\mu$ M 6xHis Ms ROP6 (kontroll) jelenlétében teszteltük. A reakcióelegyben szubsztrátként alkalmazott hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> molekula kezdeti, és a reakció utáni mennyiségét specifikus ellenanyaggal detektáltuk.

### Az NRP fehérjék *in vivo* kölcsönhatnak a PP2A<sub>C</sub> és a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> molekulákkal

Hogy alátámasszuk az NRP-k *in vivo* foszfatázgátló hatását, megvizsgáltuk, vajon kölcsönhatnak-e a PP2A<sub>C</sub> és a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> molekulákkal. Ennek érdekében ko-immunoprecipitálást hajtottunk végre. Első lépésként a PP2A<sub>C</sub>-t felismerő ellenanyagot adtuk hozzá a növényi kivonatokhoz, majd NRP ellenanyaggal immunoblot vizsgálatnak vetettük alá az ellenanyag által megkötött precipitátumot. Mind a lúdfű, mind a lucerna NRP kölcsönhatást mutatott a PP2A katalitikus alegységével ezekben a növényekben (13. ábra).

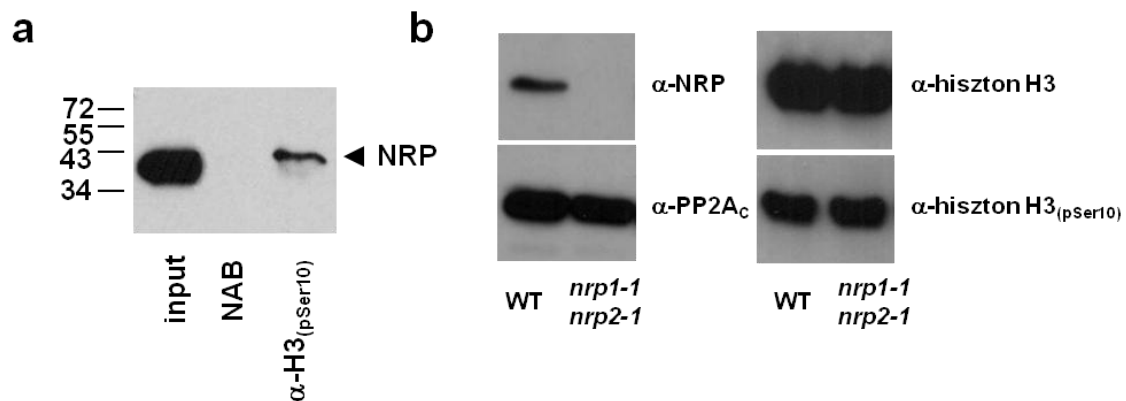


### 13. ábra. A lúdfű és lucerna NRP fehérjék kölcsönhatnak a PP2A enzimmal

Az NRP-k és a PP2A katalitikus alegysége közti kölcsönhatást ko-immunoprecipitálással mutattuk ki. A PP2Ac-t felismerő ellenanyagot lúdfű (bal oldal), vagy lucerna (jobb oldal) növényekből származó fehérje kivonatokhoz adtuk hozzá, majd a kikötött ellenanyagról lemosott eluátumot lúdfű, ill. lucerna anti-NRP ellenanyaggal immunoblot vizsgálat alá vetettük. Az input minta mutatja az NRP-k kezdeti szintjét az immunoprecipitálás során használt növényi kivonatokban. Az NAB („no antibody”) minta pedig a PP2Ac ellenanyag nélkül készített kontroll.

Hasonló vizsgálatot végeztünk hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-at felismerő ellenanyaggal is. A 8.A ábra mutatja, hogy a lúdfű NRP együtt tisztítódott a foszforilált hiszton H3-at tartalmazó kromatinnal, ami arra utal, hogy az *ecetmuslica* SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>-hoz hasonlóan a lúdfű NRP-k is kötődnek a Ser10 pozícióban foszforilált hiszton H3-hoz. *Drosophilaban* hősokkot követően a korábban transzkripciósan aktív gének helyén defoszforilálódik a hiszton H3 molekula, amelyben a PP2A enzimnek kulcsfontosságú szerepe van. Emellett a hősokk géneknél hiszton H3 foszforiláció történik a 10. szerinen. A SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérje pedig a hősokk géneknél halmozódik fel hősokk során. Mindezeket figyelembe véve azt feltételeztük, hogy a növényi NRP-k is szerepet játszhatnak a hiszton H3 defoszforiláció szabályozásában. Meglepetésünkre azonban azok a lúdfű dupla mutáns növények, amelyek sem az NRP1, sem az NRP2 génjét nem fejezik ki (*nrp1-1 nrp2-1* lúdfű mutánsok) nem mutattak eltérő foszfohiszton H3 szintet a vad típusú növényekhez képest (14. ábra). Ezt az is okozhatja, hogy a hiszton H3 defoszforiláció a sejtekben nem egy általános jelenség, hanem csak bizonyos hatásra, vagy csak bizonyos géneknél fordul elő. Az is lehetséges azonban, hogy az NRP-vel rokon NAP fehérjék átveszik, vagy

részben átveszik az NRP proteinek PP2A gátlásban betöltött szerepét a növényi sejtekben.



**14. ábra. A foszforilált hiszton H3 kölcsönhat az NRP-vel, mennyisége azonban nem változik annak hiányában**

**a.** A lúdfű NRP és a foszforilált hiszton H3 *in vivo* kölcsönhatását - tisztított kromatinon végrehajtott ko-immunoprecipitálással mutattuk ki. Mintáinkhoz a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> –at felismerő ellenanyagot adtuk hozzá, majd a kikötött ellenanyagról lemosott eluátumot immunoblottal, NRP ellenanyag felhasználásával teszteltük. Az input minta mutatja az NRP-k szintjét az immunoprecipitálás során használt kromatin preparátumban. Az NAB (no antibody) minta pedig a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> ellenanyag nélkül készült kontroll.

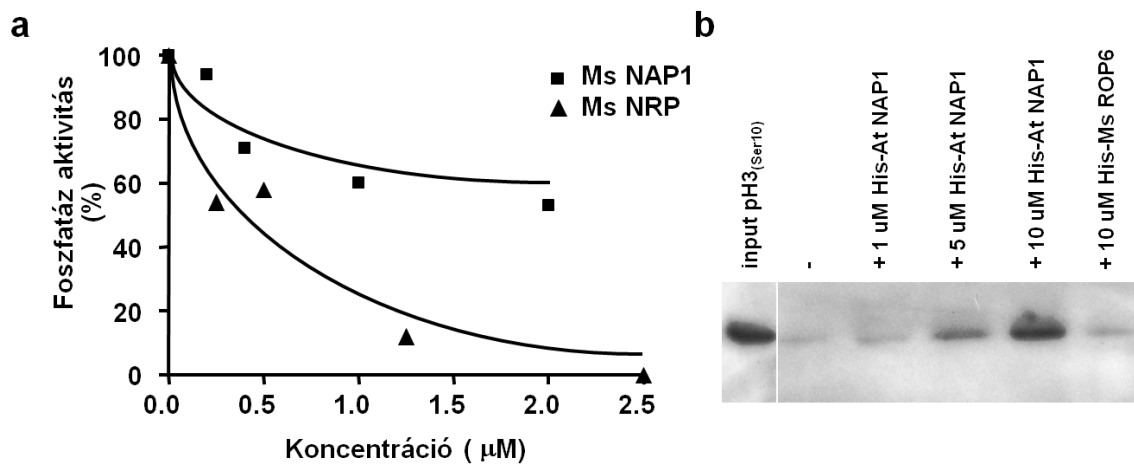
**b.** A sejtekben előforduló hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> mennyisége azonos a vad típusú, és az NRP-hiányos dupla mutáns növényekben. Az ábrán lúdfű növényekből nyert preparátumokon végzett immunoblot kísérletek eredménye látható, melyeket At NRP1, PP2Ac, hiszton H3, ill. hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> ellenanyaggal végeztük el.

**A növényi NAP fehérjék is gátolják a PP2A aktivitását *in vitro***

Hogy az előbbi felvetést megvizsgáljuk, teszteltük a növényi NAP fehérjék PP2A gátló hatását. A hisztidin véggel tisztított lucerna NAP1 dóziszfüggő módon gátolta a nyúl vázizomból izolált PP2Ac enzimet, foszforilált hiszton szubsztrát alkalmazása során. Összehasonlítva azonban ezt a gátló hatást a lucerna NRP gátló hatásával, kitűnik, hogy a lucerna NAP1 fehérje kevésbé hatékony a foszfatáz gátlásban: az 50 %-os gátlás

eléréséhez legalább ötször magasabb lucerna NAP1 koncentrációra volt szükség (15. ábra).

Hasonlóan, az immunprecipitált lúdfű PP2A enzimmel végzett foszfatáz reakció teljes gátlásához már elegendő volt 2  $\mu\text{M}$  At NRP1, míg At NAP1;2 fehérjéből 10  $\mu\text{M}$  mennyiségre volt ehhez szükség. Ebben a kísérletben specifikus ellenanyag segítségével megkötöttük a növényi extraktumokban lévő PP2A enzimet, majd hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-et, növekvő koncentrációban tisztított At NAP1;2 fehérjét, ill. negatív kontrollként tisztított Ms ROP6 fehérjét adtunk a reakcióelegyhez. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy nem kizárt az NRP és a NAP fehérjék átfedő szerepe a hiszton defoszforiláció szabályozásában növényi sejtekben.



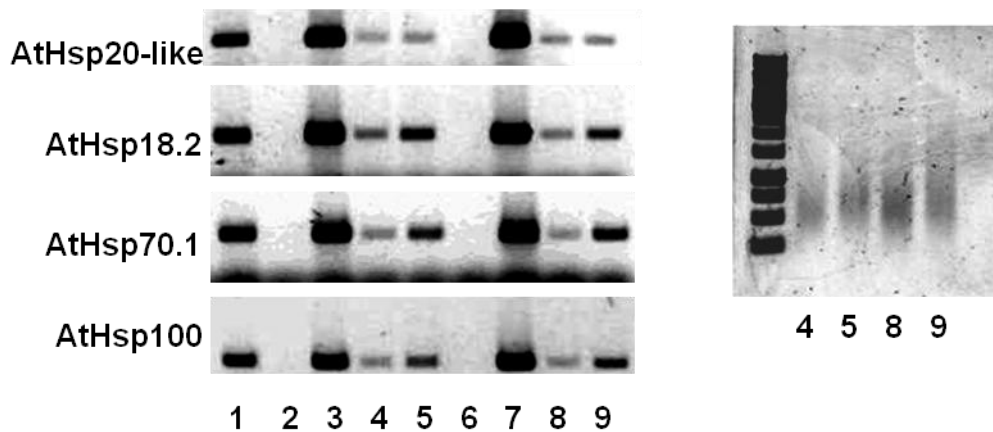
### 15. ábra. A növényi NAP fehérjék gátolják a Protein Foszfatáz 2A működését

**a.** A lucerna NAP és NRP fehérjék gátolják a PP2A enzimet in vitro. A nyúl vázizomból preparált PP2A aktivitását vizsgáltuk 6xHis véggel tisztított rekombináns Ms NAP1(■), ill. Ms NRP(▲) jelenlétében. A rekombináns fehérjék hiányában mért foszfatáz aktivitást 100%-nak vettük. A defoszforilációt foszforilált hiszton H3 szubsztráton mértük. A grafikon két független kísérlet átlagát jelöli.

**b.** A lúdfű At NAP1.2 gátolja az At PP2A enzim működését hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> fehérjével szemben. Az immunprecipitált lúdfű PP2A defoszforiláló hatását 1-10  $\mu\text{M}$  mennyiségű 6xHis At NAP1.2, vagy 10  $\mu\text{M}$  Ms ROP6 (kontroll) jelenlétében vizsgáltuk. A reakcióelegyben lévő kezdeti (input), és fennmaradó hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> mennyiségét immunblot vizsgálattal ellenőriztük.

## A hiszton H3 defoszforiláció és az NRP-k lehetséges szerepe a transzkripció szabályzásában

Mivel ecetmuslicában a hősokkot követő hiszton H3 defoszforilációt a PP2A szabályozza, a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> pedig a hősokk géneknél halmozódik fel, mi is megvizsgáltuk, hogy felhalmozódik-e foszfo-hiszton H3 a hősokk fehérjék (heat shock protein, HSP) génjének promótereinél lúdfűben. Ennek érdekében kromatin immunoprecipitációt (chromatin immunoprecipitation, ChIP) hajtottunk végre dupla mutáns és vad típusú növényeken, hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> -at felismerő ellenanyag segítségével. A növényeket hősokkknak vetettük alá a kromatin izolálását megelőzően, majd a 10-es számú szerin oldalláncon foszforilált hiszton H3-at tartalmazó kromatinból tisztított DNS-en PCR-t végeztünk három hősokk fehérje génjének promóterszekvenciáit keresve. Referenciaként az At HSP20-szerű fehérje génjét használtuk, amelynek kifejeződése nem függ a hőkezeléstől (Genevestigator adatbázis és RT-QPCR kísérleteink alapján). Eredményeink azt mutatták, hogy a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> -at felismerő ellenanyaggal precipitált kromatinban feldúsultak a hősokk gének promóterszekvenciái a hősokkolt növényekben a kezeletlen növényekhez képest. A mutáns és vad típusú növények között azonban jelentős különbséget nem találtunk az általunk vizsgált gének tekintetében (16. ábra).



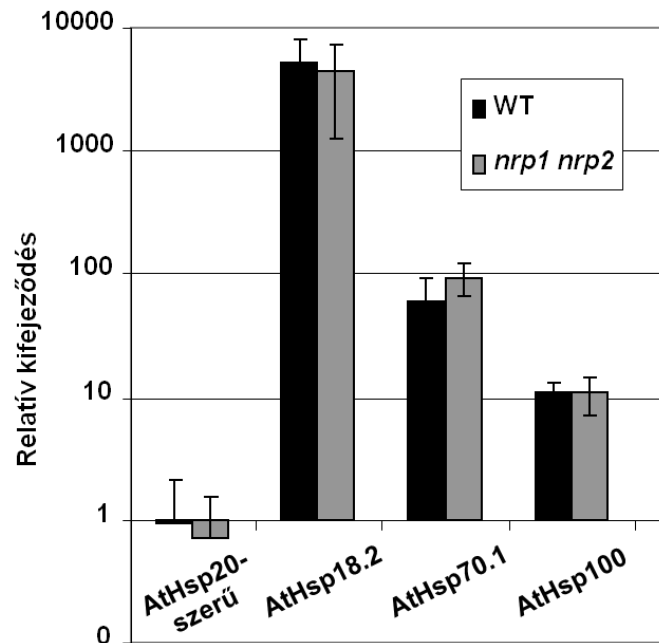
**16. ábra. A hiszton H3 10-es szerin oldalláncának foszforiláltsági állapota hősokk gének promóter szekvenciái körül hősokkot követően**

A felvételen a kromatin immunoprecipitációt (ChIP) követően végzett PCR reakciók eredményei láthatóak (bal oldal), melyhez az alábbi templátokat használtuk: 1, genomiális DNS (pozitív PCR kontroll); 2-5, vad típusú növény; 6-9, nrp 1-1 nrp2-1 mutáns növény; 2 és 6, immunoprecipitáció elsődleges ellenanyag nélkül (negatív kontroll); 3 és 7, input kromatin) pozitív ChIP kontroll); 4 és 8, immunoprecipitált kromatin kezeletlen növényekből; 5 és 9, immunoprecipitált kromatin hősokkolt növényekből (38 °C, 1 óra). A kromatin immunoprecipitálást hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> -at felismerő ellenanyaggal végeztük. A PCR reakciót az ábrán megjelölt gének promóterszekvenciáit felismerő primerekkel hajtottuk végre. A jobb oldali ábrán az input kromatinban található DNS etídium-bromidos festése látható (futtatási kontroll).

**Az NRP fehérjék nem szükségesek a hősokk gének átíródásához**

Valós idejű PCR-rel teszteltük az előző kísérletben vizsgált három HSP gén kifejeződését 38 °C-os hősokkot követően, a dupla mutáns és a vad típusú növényekben. Kontrollként itt is az At HSP20-szerű fehérje génjét használtuk. A 17. ábra mutatja a vizsgált gének relatív kifejeződését, amelyet a kezeletlen kontroll növényekben mért UBC18 ubiquitin-konjugáló enzim, mint háztartási gén transzkripciójához viszonyítottunk. A vad típusú és a dupla mutáns növények között nem találtunk különbséget ezen gének kifejeződésében, a vizsgált körülmények között. Azt is megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott hőkezelés befolyásolja-e a PP2A, a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>, és az NRP fehérjék közti

kölcsönhatást. A lúdfű NRP hősokk kezelés után is kötődött vizsgálataink során mind a PP2A-val, mind a foszforilált hiszton H3-mal. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy lúdfűben a hősokk gének kifejeződésének szabályozásában nem vesznek részt az NRP fehérjék.



### 17. ábra. Hősokk gének kifejeződésének összehasonlítása vad típusú és *nrp1-1 nrp2-1* növények között

Kezeletlen, ill. hősokkolt (1 óra 38°C-on); vad típusú (WT) és *nrp1-1 nrp2-1* mutáns növények felhasználásával végzett valós idejű kvantitatív PCR eredménye látható a grafikonon. A feltüntetett hősokk gének relatív kifejeződését egy háztartási gén, az UBC18 kifejeződéséhez normalizáltuk. Három független biológiai ismétlésből származó adatok átlagát és szórásait tüntettük fel. Minden alkalommal három technikai ismétléssel hajtottuk végre a PCR reakciókat.

### A lúdfű NRP fehérjék sejtbeli lokalizációja

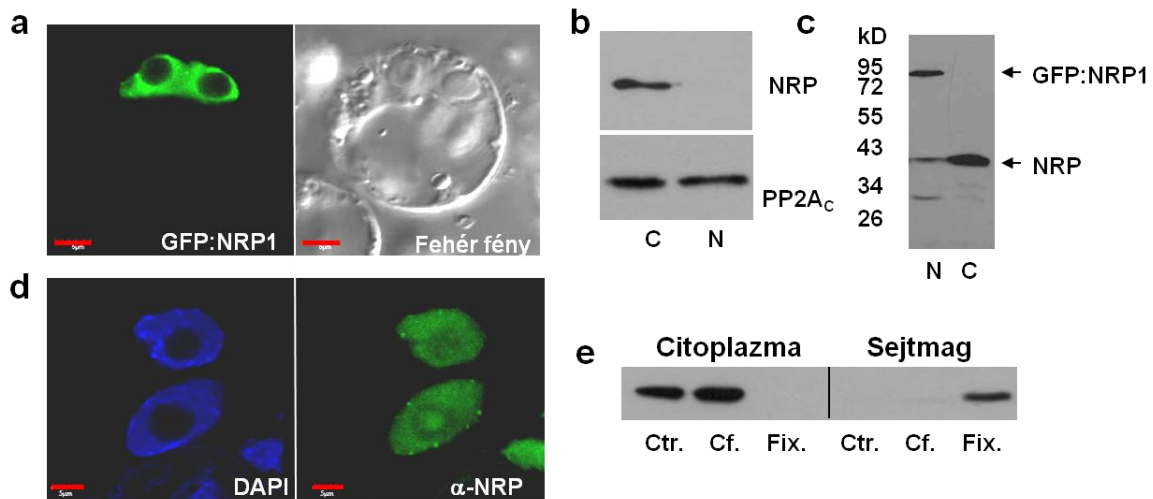
Mivel a lúdfű NRP fehérjék kölcsönhatnak hisztonokkal, feltételezhető volt, hogy a sejtmagban, vagy a sejtmagban is, előfordulnak. Ennek megfelelően a zöld fluoreszcens fehérjével (green fluorescent protein, GFP) fúzionált At NRP1(GFP:NRP1) sejtmagi



jelölődést mutatott fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva (18.a ábra). Meglepetésünkre azonban, a citoplazmikus frakcióban jelentek meg az NRP fehérjék az immunoblot vizsgálatok során, mikor is a növényi extraktumokat szétválasztottuk sejtmagi, ill. citoplazmikus frakcióra (18.b ábra). Hogy tovább vizsgáljuk ezt a kérdést, GFP-vel fúzionált AtNRP1 génjével transzformált protoplasztokat választottunk szét sejtmagi és citoplazmás frakcióra, majd immunoblottal ellenőriztük a mintákban lévő NRP fehérjék jelenlétét. Az endogén NRP proteinek nagyrészt a citoplazmikus frakcióban jelentkeztek, míg a GFP:NRP1 kizárólag a sejtmagban (18.c ábra). Ebből arra következtettünk, hogy ebben az esetben a GFP todalék felelős az AtNRP1 sejtmagi elhelyezkedéséért.

Hogy ezt az elméletet alátámasszuk, immunfluoreszcencia vizsgálattal is teszteltük az NRP fehérjék elhelyezkedését, azzal az NRP ellenanyaggal, amelyet az immunoblot analíziseknél is használtunk. Ez a kísérlet azonban újból meglepő eredményt hozott: az intakt sejtekben az NRP proteinek a sejtmagban lokalizálódtak (12.D ábra).

Ekkor azt feltételeztük, hogy a sejtmagok feltárásának folyamata közben szabadul ki a sejtmagból a viszonylag kis méretű (kb. 30 kDa) At NRP 1 fehérje, amit a hozzá kapcsolódó GFP méreténél fogva megakadályoz. Ezért a feltárás előtt formaldehiddel fixáltuk a sejteket, és a folyamat közben több alkalommal mintát vettünk. A 18.e ábra mutatja, hogy az NRP a fixált sejtekben a sejtmagban található, míg a nem fixált sejteknél a felülúszó citoplazmában. A centrifugálás nem befolyásolta az NRP-k citoplazmába való kiszabadulását (a kontroll, nem fixált sejtekhez képest). Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az NRP-k nem kötődnek erősen a kromatinhoz, hanem oldott, mozgékony, állapotban vannak jelen a sejtmagban.



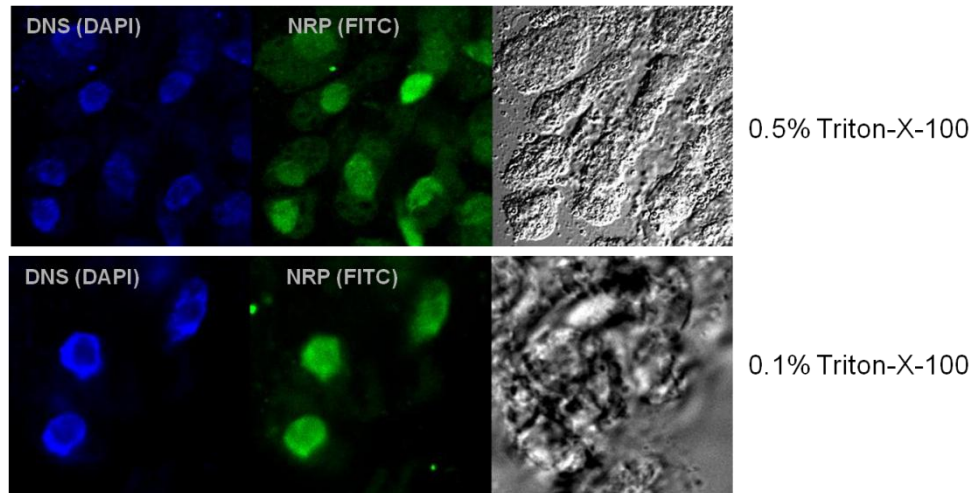
### 18. ábra. Az NRP fehérjék előfordulása a sejten belül különböző módszerekkel

- a.** A lúdfű transzformált protoplasztokban a GFP-hez kötött NRP1 (GFP:NRP1) a sejtmagban lokalizálódik. A piros vonal 5  $\mu\text{m}$  nagyságot jelöl.
- b.** Az NRP fehérjék és a PP2Ac immunológiai detektálása citoplazmás (C) és nukleáris (N) fehérje frakciókban.
- c.** Az endogén NRP fehérjék és a GFP:NRP1 immunológiai detektálása transzformált protoplasztokból származó citoplazmás (C) és nukleáris (N) fehérje frakciókban.
- d.** Az NRP-k detektálása indirekt immunfluoreszcencia vizsgálattal lúdfű sejtuszpenzióban. Bal oldalt a DAPI festés látható (DNS festődése), jobb oldalt pedig az NRP indirekt immunfluoreszcenciával detektálva.
- e.** Az NRP proteinek immunológiai detektálása citoplazmás (C) és nukleáris (N) fehérje frakciókban centrifugálás előtt (Ctr), centrifugálás után (Cf), ill. centrifugálás és fixálás után (Fix).

### További bizonyítékok az At NRP1 sejtmagi lokalizációjára

Amikor képkötésre előkészítjük a növényi mintáinkat, emésztő enzimeket, detergenset alkalmazunk, hogy az ellenanyagok, festékek könnyebben bejussanak a sejtekbe, vagy protoplasztokba. Mindezen anyagok befolyásolhatják a kísérlet kimenetelét. A detergens, enzimek ugyanis fellazíthatják a maghártyát, ami lehetővé teszi az NRP fehérjék sejtmagból való kiszabadulását. A sejtmagi frakció előállításához

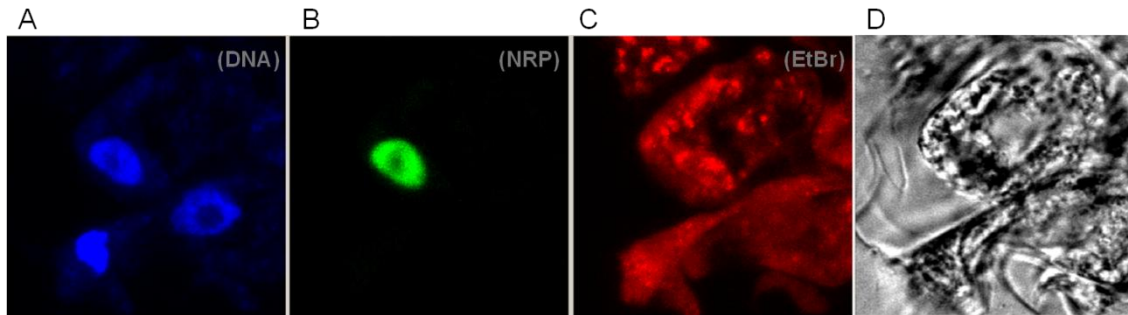
használt feltáró pufferben lévő detergensnek ily módon hozzájárulhattak ahhoz, hogy immunoblot kísérletünkben a citoplazmát tartalmazó frakcióba kerültek az NRP fehérjék. Erre utalt az a kísérletünk, melyben 0,5% Triton X-100 detergens jelenlétében fixált sejteknél az NRP ellenanyaggal végzett immunolokalizáció jól detektálható citoplazmikus festődést is mutatott a nagyrészt sejtmagi jelölés mellett (19. ábra). Amikor viszont csökkentettük a Triton X-100 koncentrációját 0,1%-ra, redukálódott a citoplazmikus jel (19. ábra).



**19. ábra. Különböző koncentrációjú detergens jelenlétében fixált sejteken végzett immunolokalizáció**

A magas koncentrációban alkalmazott detergensnek segítik a sejtmagi NRP fehérjék kiszabadulását és citoplazmatikus megjelenését. Csökkentett koncentrációjú Triton X-100 mellett az NRP proteinek kevésbé jutottak ki a citoplazmába. Az immunolokalizációt a fixált sejteken NRP elleni elsődleges, és FITC festékkel ellátott másodlagos ellenanyaggal végeztük. A sejtmagokat DAPI festékkel tettük láthatóvá.

Hogy a detergensnek és protoplasztáló enzimek hatását kizárjuk, következő kísérletünkben detergensnek alkalmazása nélkül formaldehidben közvetlenül mechanikailag (pengével) feltárt sejteken végeztünk immunolokalizációt. Ekkor a FITC másodlagos ellenanyaggal megjelölt NRP jel kizárólag a sejtmagban volt látható (20. ábra).



**20. ábra. NRP immunolokalizáció formaldehidben mechanikusan feltárt lúdfű sejteken**

Detergensok és enzimek kizárásával 5% formaldehidben pengével mechanikusan megsértve tártunk fel lúdfű sejteket, majd immunolokalizációt végeztünk rajtuk NRP ellenanyaggal. Ily módon NRP-jelet csak azokban a megvágott sejtekben láthatunk, amelyekbe az ellenanyagok bejutottak.

A. DAPI festés (DNS)

B. NRP immunológiailag detektálva

C. Etídium-bromid festés (citoplazma, RNS-ek megjelölésére)

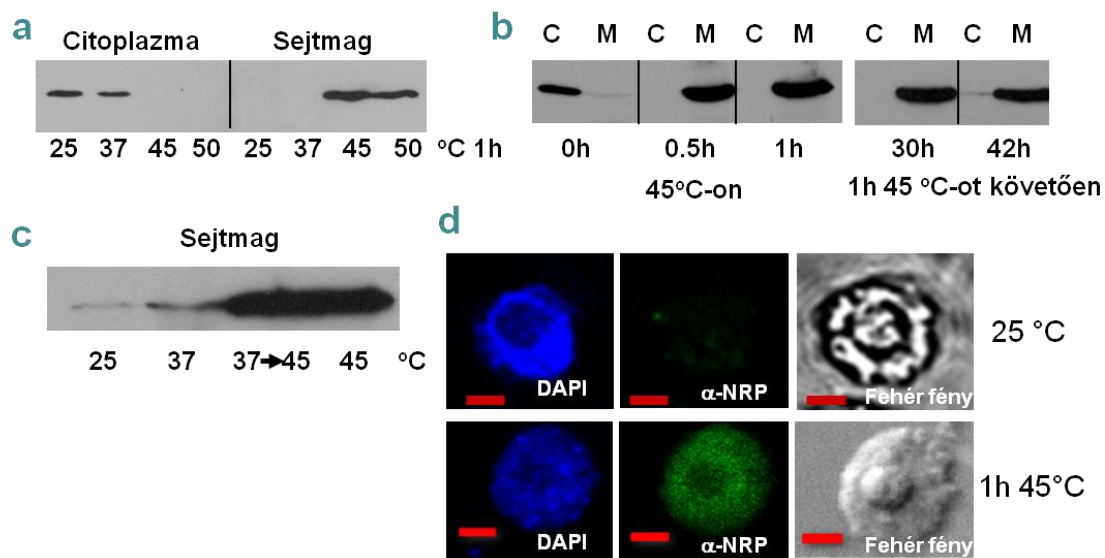
D. Fehér áteső fényben látható sejtek

**Az NRP-k hőszokk hatására erősen kötődnek a kromatinhoz**

A következő kísérletünkben azt vizsgáltuk meg, hogy a hőszokk befolyásolja-e az NRP-k sejten belüli lokalizációját. A 21.a ábrán látható, hogy erős hőszokk (>45°C, 1 óra) hatására az NRP-k sejtmagban maradtak a sejtmag preparálás során, míg gyengébb hőszokk (37°C) hatására kiúsztak a citoplazmát tartalmazó felülúszóba. Tovább vizsgálva ezt a kérdést megállapítottuk, hogy már fél óra 45°C-os kezelés elegendő a sejtmagi kötött állapot eléréséhez, ami a hőkezelést követően hosszú ideig (vizsgálatunkban 42 órán át) fennmaradt (20.b ábra). Azt is megállapítottuk továbbá, hogy a 45°C-os kezelést megelőző 37°C-os előkezelés nem befolyásolta az NRP-k sejtmagban való maradását (20.c ábra)

Ezt a jelenséget tovább kutattuk immunfluoreszcencia vizsgálattal, kontroll és hőkezelt fixálatlan sejtekből preparált sejtmagokkal. Az NRP fehérjét felismerő ellenanyag a

hőkezelt sejtmagokban nagy mennyiségben mutatott ki NRP proteineket, a kontroll magok ezzel szemben alig mutattak fluoreszcens festődést (20.d ábra).



**20. ábra. Az NRP fehérjék a sejtmagban maradnak 45°C-os hősokk után**

**a.** Az NRP fehérjéket a citoplazmában detektáltuk immunoblot módszerrel 25 és 37°C esetén; 45, vagy 50°C-os kezelés után viszont a sejtmagban.

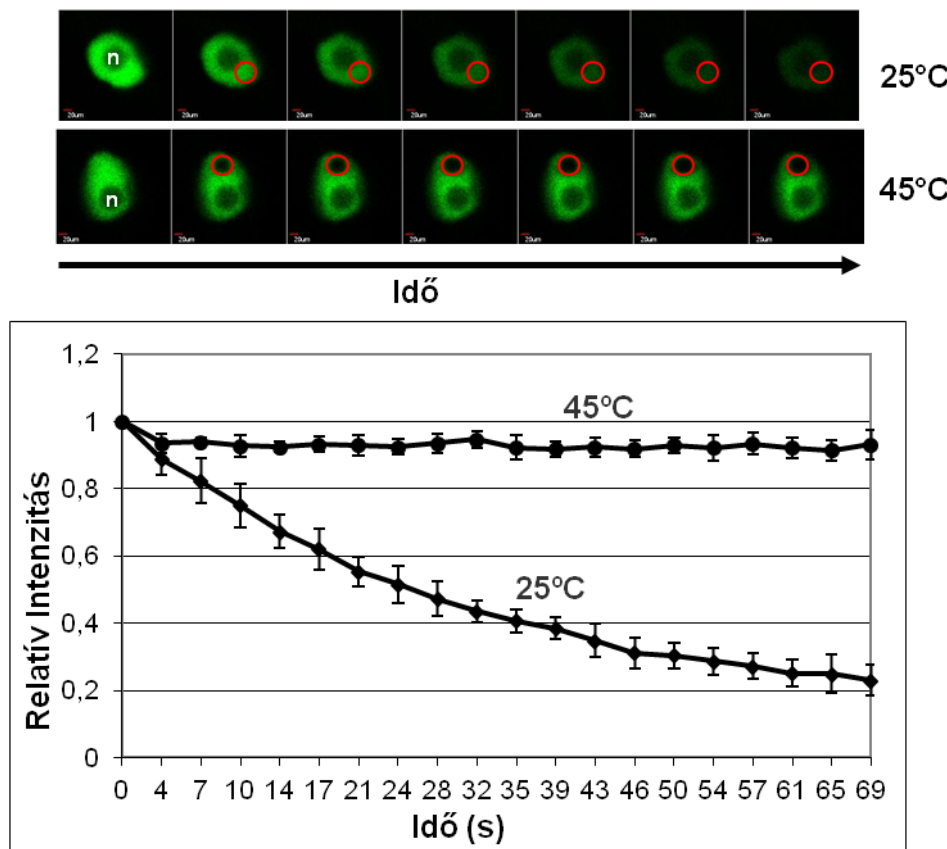
**b.** Az NRP fehérjék a sejtmagi preparátumban már 30 perc 45°C-os kezelés után felhalmozódtak, és a kezelést követően legalább 42 órán át kötődve maradtak. (Immunoblot detekció.)

**c.** Az NRP fehérjék a sejtmagban halmozódtak fel 45°C-os kezelés után, 37°C-os előkezelést követően is. (Immunoblot detektáció.)

**d.** Az NRP fehérjéket indirekt immunfluoreszcencia vizsgálattal tettük láthatóvá, kontroll (felső ábrarész), és hősokkolt (alsó ábrarész) lúdfű növényekből izolált sejtmagokban. Ugyanezen sejtmagok DAPI-festése, és áteső fehér fényben készült képe is látható. A piros vonal 5 µm nagyságot jelöl.

Az NRP fehérjék hő hatására történő sejtmagi immobilizálásához további bizonyítékot szolgáltatott a fluoreszcencia kiégetés (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) kísérletünk. Ebben a vizsgálatban GFP:NRP1 molekulát kifejező transzformált lúdfű protoplasztokat használtunk. A fluoreszcens jelet mutató sejtmagokat egy pontban erős lézerral világitottuk meg, és közben egy másik pontban mértük a fluoreszcencia erősségét. A kezeletlen protoplasztokban a lézerral való kiégetés azt eredményezte,

hogy a mobilis GFP:NRP1-nek köszönhetően az egész sejtmagban folyamatosan csökkent a fluoreszcencia. Ezzel szemben a hőkezelt protoplasztokban a GFP emisszió kizárólag a megvilágított pontban veszett el, ami arra utalt, hogy a GFP:NRP1 mobilitása ezekben a sejtekben megszűnt (21. ábra).

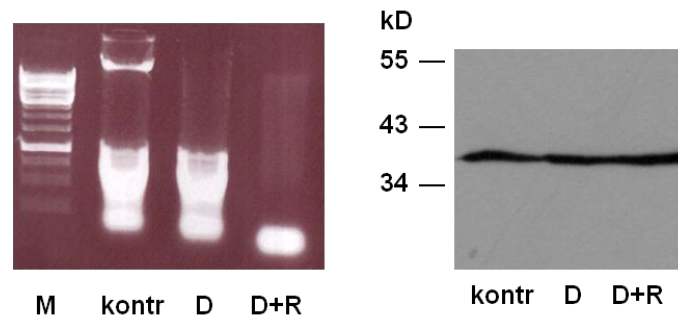


### 21. ábra. A sejtmagi NRP fehérje magas hő hatására immobilizálódik

A GFP:NRP1-et kifejező lúdfű protoplasztok FLIP vizsgálata során készült felvételeken „n” a sejtmagvacskát jelöli, piros karikákkal a kiégetés helyét jelöltük. A felső sorban egy szobahőmérsékleten tartott protoplasztról készített felvételsorozat látható, alatta egy 45°C-os hőkezelést elszenvedett protoplaszt időben egymást követő felvételeit tüntettük fel. A grafikon a GFP fluoreszcencia relatív intenzitását mutatja, amelyet a sejtmag egy, a kiégetés helyétől kívül eső területén mértünk. Öt protoplaszt méréséből származó átlagot és a hozzá tartozó szórást mutatja az ábra.

Megvizsgáltuk azt is, hogy lehetséges-e, hogy az NRP-k nukleinsavakhoz kötődnek a sejtmagban. A hőkezelt sejtmagokon DNáz, vagy RNáz kezelést hajtottunk végre, majd immunhisztokémiaileg vizsgáltuk az NRP fehérjék sejtmagi jelenlétét. Az NRP proteinek

ezekben a mintákban is a sejtmagban maradtak (22. ábra), ami arra utal, hogy az NRP proteinek hő hatására sejtmagi fehérjékhez kötődnek, feltehetően hisztonokhoz.



### 22. ábra. Az NRP fehérjék nem nukleinsavakhoz kötődnek a sejtmagban

Az NRP fehérjék hőre történő immobilizálódását sem a DNáz, sem az RNáz kezelés nem befolyásolja. Balra az izolált sejtmagokból származó etídium-bromiddal festett nukleinsavak láthatók agaróz gél elektroforézis után, jobbra az NRP fehérjék láthatók ugyanazon mintákból immunoblottal láthatóvá téve.

**M** – molekulásúly marker

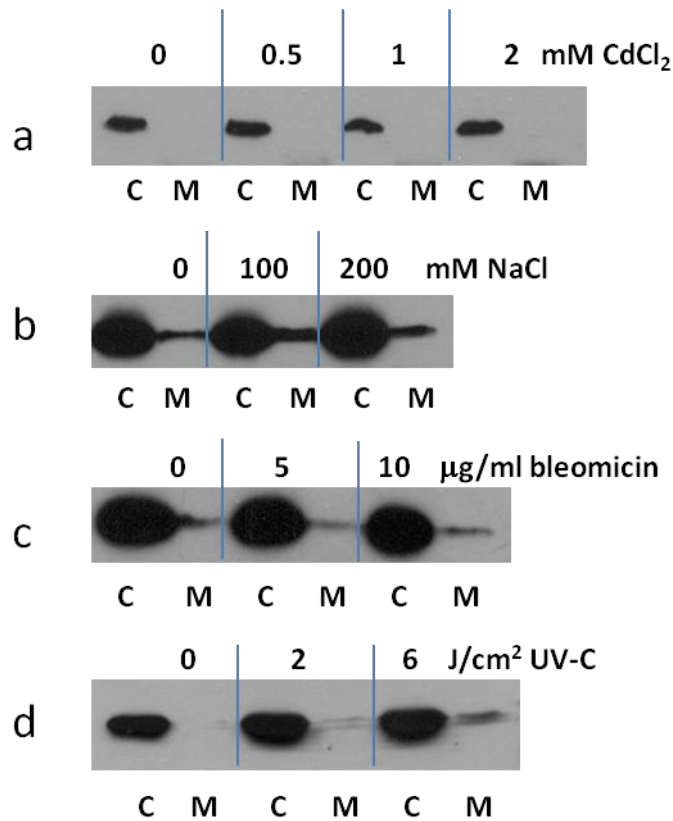
**kontr** – kezeletlen

**D**- DNáz kezelt

**R**-RNáz kezelt)

### Az NRP fehérjék hőszokkon kívül más fajta stressz hatására nem kötődnek a kromatinhoz

Hogy megvizsgáljuk az NRP fehérjék kromatinhoz való kötődésének egyéb esetleges kiváltó okait, különböző stresszkezeléseknek vetettünk alá lúdfű növényeket. Só-, nehézfém-, genotoxikus-, és UV-stresszt alkalmaztunk. Egyik kezelés hatására sem tapasztaltunk olyan jelenséget, amelyet a 45°C-os hőszokknál értünk el, azaz az NRP fehérjék mindig a citoplazmás frakcióba kerültek ezek között a körülmények között, vagyis mobilisak maradtak (23. ábra). Az NRP proteinek kromatinhoz való kötődése tehát nem általános stresszválasz.



### 23. ábra. Különböző stressz kezelések hatása az NRP fehérjék mobilitására

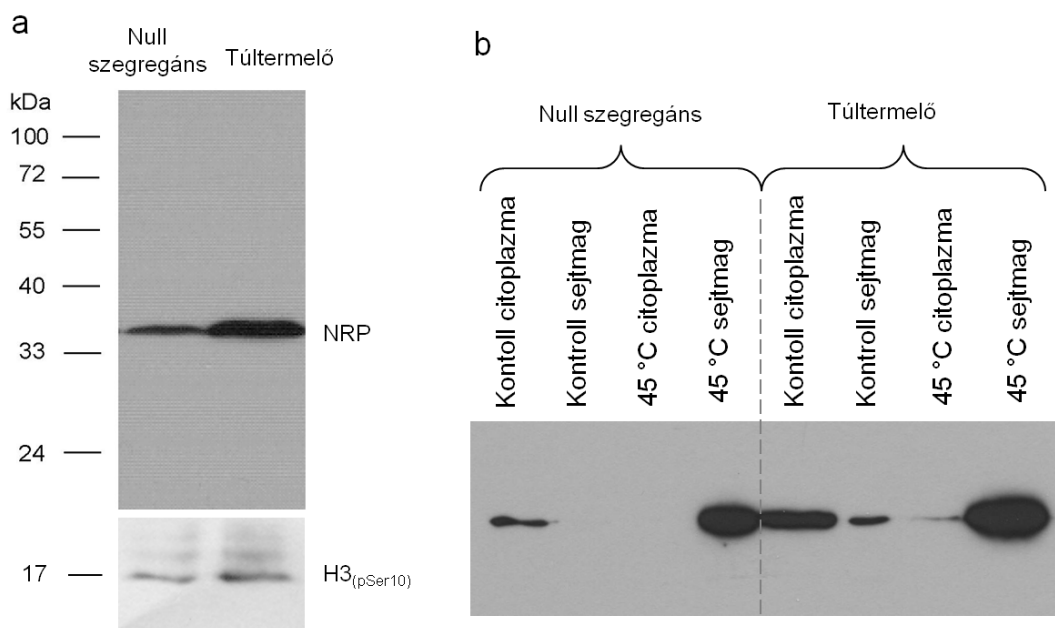
Az NRP fehérjék sejtmagban történő megkötődése nem általános stresszválasz. Nehézfém (CdCl<sub>2</sub>) (a), só (b), genotoxikus stressz (bleomicin) (c), és UV-C sugárzás (d) kezelések egyikére sem történt meg az NRP proteinek sejtmagi frakcióban (M) való megjelenése. Mindegyik esetben a citoplazmát tartalmazó frakcióban (C) detektáltuk az NRP fehérjéket immunoblot vizsgálataink során.

### Az At NRP1-túltermelő növények ellenőrzése

Lúdfű növényekből rendelkezésünkre állt néhány At NRP1-et túltermelő transzformált vonal. Ezek T2 generációjának egyedét vizsgáltuk, kontroll növényként a transzgén nem tartalmazó null szegregáns egyedeket használva. Immunoblot technikával ellenőriztük a növényekben lévő AtNRP1 fehérje szintjét. Ehhez három hetes egész csíranövényeket használtunk. A 20.a ábra tanúsága szerint a túltermelő növények valóban nagyobb mennyiségben tartalmaztak NRP fehérjéket, a kontroll csíranövényekhez képest. A túltermelő növények nem mutattak eltérő fenotípust a null



szegregáns és a vad típusú növényekhez képest az általunk alkalmazott laboratóriumi körülmények között, sem különböző só- és hormonkezelések hatására. Azt is megvizsgáltuk, hogy a túltermelő vonalban hogyan alakul az NRP proteinek kromatinhoz való kötöttsége kezeletlen, ill. 45°-os hőszokknak kitett növényekben. Ezeknél a vonalaknál is hasonló eredményt kaptunk, mint a vad típusú növényeknél: hőszokk hatására nagy mennyiségben halmozódnak fel NRP fehérjék a sejtmagi preparátumban (24.b ábra). Ellenőriztük a túltermelő növényekben a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> általános szintjét is. A csíranövényekben nem találtunk jelentős különbséget a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> mennyiségében a túltermelő és a szegregáns növények között.



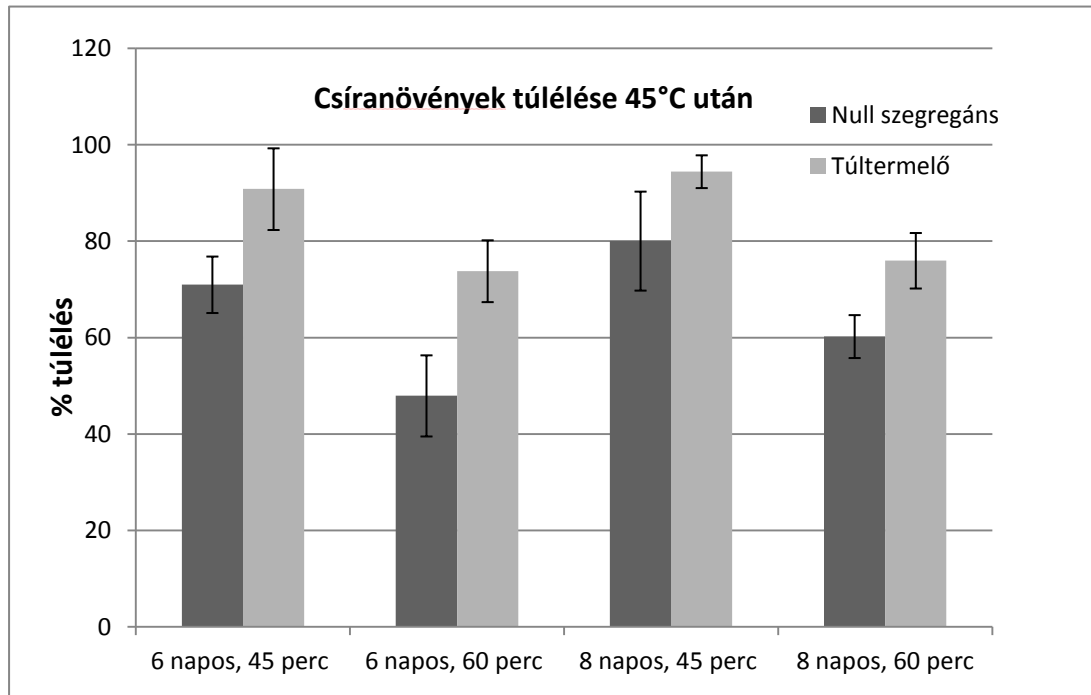
**24. ábra. Az At NRP1 fehérjét túltermelő és a null szegregáns lúdfű növények immunoblot vizsgálatai**

**a.** A túltermelő növényekben jóval magasabb az NRP fehérjék mennyisége a null szegregáns növényekhez képest. A hiszton H3(pSer10) mennyisége azonban nem mutat jelentős eltérést.

**b.** Az NRP fehérjék lokalizációját megvizsgáltuk null szegregáns és túltermelő növényekben is. Kezeletlen kontroll, ill. 45°C-on hőkezelt növényeket frakcionáltunk sejtmagi és citoplazmás részekre, majd NRP ellenanyaggal immunoblot vizsgálatnak vetettük alá a mintákat.

## Az AtNRP1-túltermelő növények hőtűrése

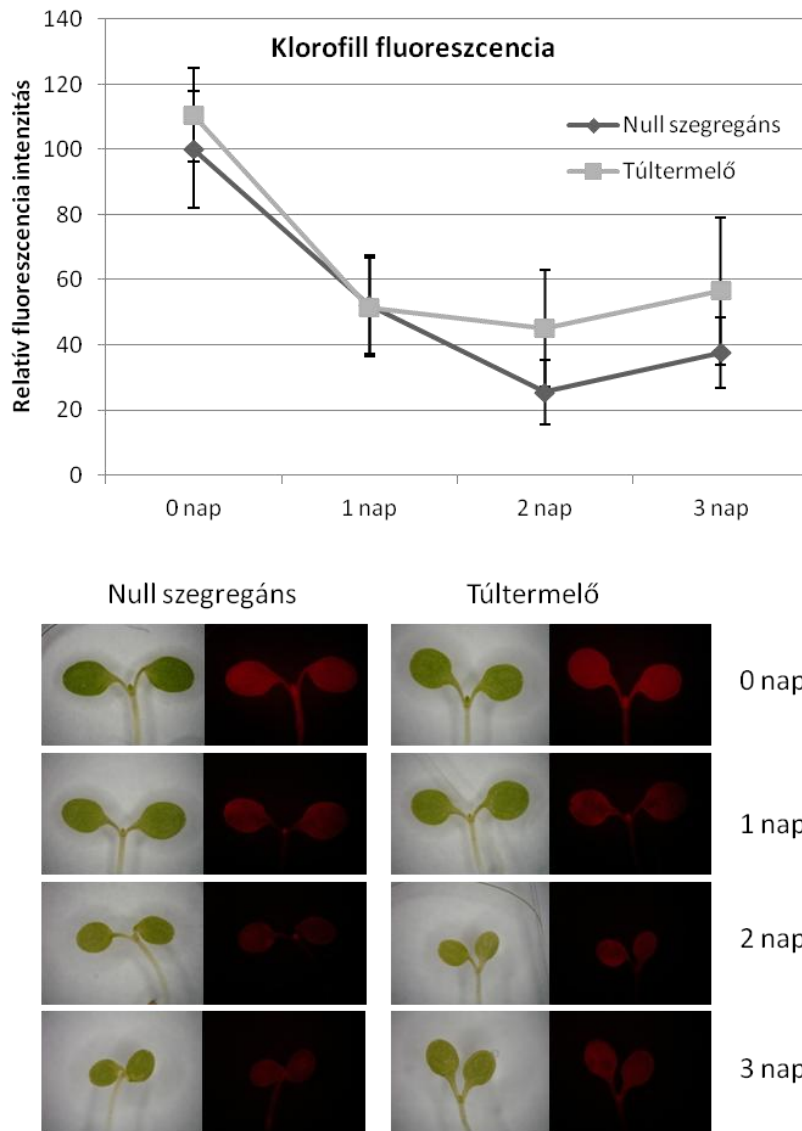
Azt is megvizsgáltuk, hogy van-e különbség hőtűrés tekintetében a két vonal között. Ennek érdekében 6 és 8 napos lúdfű csíranövényeket tartottunk 45 illetve 60 percen át 45°C-on, majd egy hét elteltével megszámoltuk a megsárgult, elhalt, ill. a zöld, még élő egyedeket. A túltermelő vonal 15-20%-kal nagyobb túlélést mutatott mindegyik általunk alkalmazott kezelés után (25. ábra).



### 25. ábra. Lúdfű növények hőtűrése

6 és 8 napos lúdfű csíranövényeket kezeltünk 45, vagy 60 percen át 45°C-on, majd egy hét elteltével megszámoltuk az elhalt, ill. az élő egyedeket. Átlagosan 200 egyed értékeléséből nyertük az adatokat. A szórás értékek a Petri-csészénkénti (50 egyed) eltéréseket mutatják.

Hogy pontosabban megvizsgáljuk ezt a kérdést, megmértük a csíranövények klorofill tartalmát a hősokkot követő első, második, és harmadik napon. A növények klorofilltartalma ugyanis szorosan összefügg azok életképességével. Öregedő és haldokló levelekben a klorofill nagymértékben bomlásnak indul. A pigment mennyiségének kimutatására egy nagyon egyszerű módszert alkalmaztunk: kék fényrel



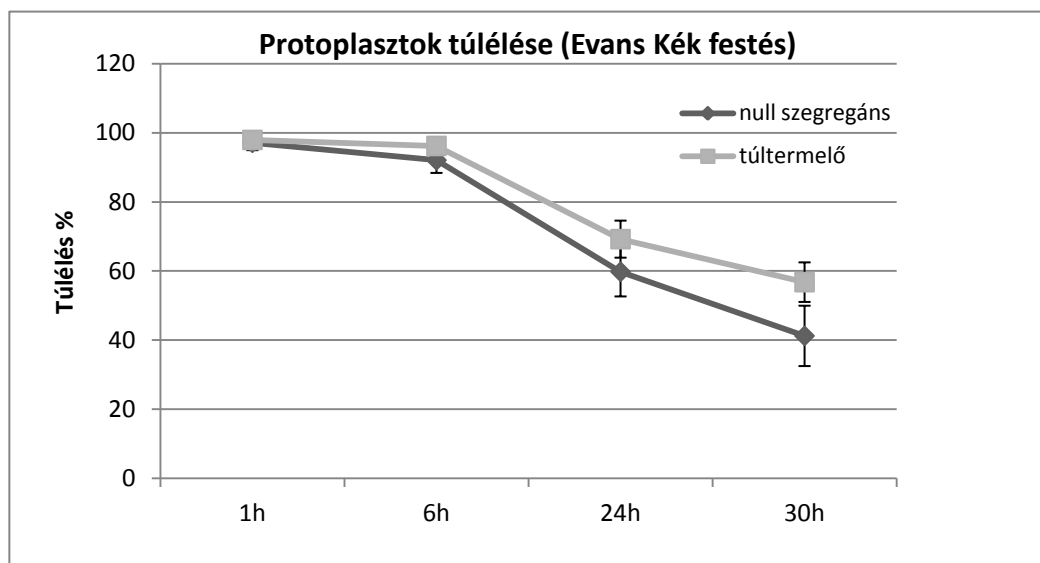
### 26. ábra. Lúdfű csíranövények klorofill fluoreszcenciájának mérése

Lúdfű csíranövények klorofill fluoreszcencia intenzitását mértük hőszokk kezelés nélkül (0 nap), valamint 1, 2, és 3 nappal a hőszokk kezelést (1h 45°C) követően. 100%-nak vettük a null szegregáns csíranövények 0.napon mért klorofill fluoreszcencia értékeinek átlagát. Mérésenként átlagosan 15 csíranövény méréseiből származó átlagot jelenítettünk meg a diagramon, jobb oldalon pedig ezek egy-egy reprezentatív példája látható.

gerjesztve felvételt készítettünk a klorofill autofluoreszcenciájáról, majd a felvételeket az ImageJ szoftver segítségével analizáltuk. A túltermelő vonal kevésbé magasabb

klorofill fluoreszcencia értékeket mutatott 2 nappal és 3 nappal a hőkezelés után, a null szegregáns csíranövényekhez képest (26. ábra).

Megvizsgáltuk ezen kívül a kétfajta lúdfű törzsből származó protoplasztok túlélését is. A protoplasztokat is 45°C-on hőkezeltük, majd Evans Kék festékekkel festettük őket meg. Ezt a festéket az intakt sejtek nem veszik fel, az elhalt sejtek viszont igen. Emiatt a sejthalál kimutatására alkalmas ez a festés. Kezelésenként és vonalanként kb. 1000 protoplaszt megszámlálásával az eddigiekhez hasonló túlélési arányt kaptunk, azaz csekély különbséggel, de a túltermelő növények mutattak nagyobb túlélési hányadot (27. ábra).



### 27. ábra. Protoplasztok túlélése Evans Kék festékekkel detektálva

45°C-on egy órán át tartott protoplasztokat Evans Kék festékekkel festettünk, és megszámloltuk az elhalt és élő sejteket 1, 6, 24, és 30 órával a hőkezelés után. A nem festődött élő sejtek két független kísérletből származó százalékos arányát ábrázoltuk szórásokkal együtt.

Sem az Evans Kék festéssel, sem a klorofill fluoreszcencia mérésekkel nem kaptunk arra utaló meggyőző eredményeket, hogy az At NRP1 szerepet játszik a növények hőstresszre adott válaszában. Ugyan mutatkozott némi eltérés a túltermelő és a null szegregáns növények közti túlélési hányadban, ezek a különbségek azonban statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

---

## Eredményeink összefoglalása

---

- A növényi NRP fehérjék *in vitro* gátolják a szerin/treonin foszfatázokat.
- A lúdfű NRP1 gátolja a hiszton H3 defoszforilálását *in vitro*.
- A növényi NAP1 és NRP fehérjék szerepe a PP2A gátlásban átfedő lehet.
- A lúdfű NRP-k kölcsönhatnak a PP2A és a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> molekulákkal *in vivo*.
- A hőindukálta génexpresszió a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-et tartalmazó kromatinhoz kötődik.
- Szobahőmérsékleten az At NRP1 a sejtmagban található szolubilis állapotban.
- Erős hőstressz hatására az AtNRP1 kereszt kötődik sejtmagi fehérjékhez és immobilizálódik.
- Az At NRP1-et túltermelő Arabidopsis növények normál körülmények között nem mutatnak fenotípusos változást.

---

## Az eredmények értékelése

---

### A növényi NRP fehérjék hatása a szerin/treonin foszfatázokra

Eukarióta sejtekben a fehérjék reverzibilis foszforilálása és defoszforilálása kulcsfontosságú szabályzó folyamatok. Kísérleteinkben a két legfontosabb szerin/treonin foszfatáz, a PP1 és a PP2A aktivitását vizsgáltuk. Mindkét enzim számtalan folyamat irányítását végzi mind állati, mind növényi sejtekben. Hogy e nagy számú folyamatban részt tudjanak venni, maguk a foszfatázok is szigorú szabályzás alá kell hogy essenek. Mindkét enzim katalitikus alegységéhez többféle szabályzó alegység kapcsolódhat, megszabva a holoenzim sejtbeli funkcióját. Ezen kívül pozitív és negatív regulátorok is kötődhetnek hozzájuk, tovább finomítva a foszfatáz aktivitás specificitását. Az egyik ilyen negatív szabályzó faktor állatokban a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>.

A humán SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> foszfatáz gátló hatását a fehérje egy hasított, 20 kD-os formájával mutatták ki. Ezt a fehérje változatot a 32 kD-os SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> proteolitikus hasítása eredményezi [8]. Növényi sejtekben nem ismert az NRP proteinek ilyen hasítása, poliklonális At NRP1 ellenanyagunk egy erős sávot ismer fel a növényi kivonatokban amely a teljeshosszúságú fehérjének felel meg. Ezért mi a teljes méretű növényi NRP fehérjéknek vizsgáltuk a foszfatázok aktivitására kifejtett hatását.

Eredményeink azt mutatták, hogy a lúdfű, és a lucerna NRP fehérjék *in vitro* gátolják az állati PP2A aktivitását. Az At NRP1 ezen felül gátolja az immunoprecipitált lúdfű PP2A enzimet, és *in vivo* kölcsönhat vele. Állatokban is kimutatták a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> és a PP2A katalitikus alegység közvetlen kölcsönhatását [8]. *In vivo* bizonyítékunk sajnos még nincsen a növényi NRP fehérjék foszfatáz gátló hatásáról. Ez a tény állatokban is csak közvetetten bizonyított: az *ecetmuslica* SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> azokon a helyeken halmozódik fel a kromatinon, ahol hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> található, annak mennyiségét pedig a PP2A szabályozza hősokkot követően.

Érdekes azonban, hogy míg az At NRP1 a PP2A mellett a PP1 foszfatázt is jelentős mértékben gátolta, addig az állati SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> kizárólag a PP2A enzimet gátolja. Sőt,

fiziológiai koncentrációjú mangán jelenlétében stimulálja a mielin bázikus fehérje és hiszton H1 szubsztrátok PP1 enzim általi defoszforilálását *in vitro* [91].

Különbséget a PP2A aktivitásában nem találtunk a vad típusú és az NRP hiányos növények között, immunoprecipitált PP2A enzimet vizsgálva. Ennek egyik lehetséges oka az, hogy a PP2A enzimmel csak elenyésző mennyiségű NRP tisztítódik együtt, ami nem okoz szemmel látható eltérést az általános PP2A aktivitásban. Az is lehetséges azonban, hogy az NRP proteinnel homológ NAP1 fehérjék komplemetálják az NRP fehérjék hiányát a növényi sejtekben. Ezt alátámasztja az a megfigyelésünk, miszerint a NAP1 fehérjék is *in vitro* PP2A gátló hatással bírnak, habár kevésbé hatékonyak, mint az NRP fehérjék.

Emberben a PP2A és a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjék együttesen szabályozzák androgén hormonok termelését a citokróm p450c17 defoszforilációjának befolyásolása révén. A citokróm p450c17 ugyanis szerin oldalláncokon foszforilált formában fejt ki liáz aktivitását, ami szükséges a szteroid hormonok szintéziséhez. Hogy a növényi sejtekben milyen faktorok defoszforilálását szabályozzák az NRP proteinek a PP2A enzimen keresztül, arról még nincs ismeretünk. Kísérleteinkben nagy affinitással gátolták a hisztonok defoszforilációját, így valószínű, hogy a velük rokon NAP1 proteinekhez hasonlóan a növényi NRP fehérjék is részt vesznek a kromatin átformálásával kapcsolatos folyamatokban. Ennek tisztázása azonban további kísérleteket igényel.

### **Az NRP fehérjék lehetséges szerepe a transzkripció szabályzásában a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> defoszforilációján keresztül.**

A hiszton fehérjék N-terminális vége gyakran megy keresztül átalakulásokon a nukleoszómában. Ezek közül a leggyakoribbak az acetiláció, a metiláció, a foszforiláció, a ubiquitináció és az ADP-riboziláció [92]. E modifikációk befolyásolják a hisztonok szerkezetét és funkcióját. A hiszton H3 foszforiláció a kromoszóma dekondenzációval, a transzkripció aktiválásával, az apoptózissal és a DNS károsodások javításával függ össze [93]. Növényekben a hiszton H3 sejtciklus függő foszforilációját írták le [94].

Állatokban a hiszton H3 tizedik szerinen történő foszforilálódása a transzkripció aktiválásával függ össze [95], [96]. Növényekben ez az összefüggés még kevésbé

tisztázott, habár kimutatták, hogy a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> szint átmenetileg hirtelen megemelkedik hideg, só, és abszcizinsav kezelésre, csakúgy, mint a stresszválasz gének átíródása [97]. A hiszton H3 foszforiláció esetleges szerepét a hősokk gének átíródásában még nem tárták fel növényekben.

Kísérleteink azt mutatták, hogy a növényi NRP fehérjék jelen vannak a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> molekulát felismerő ellenanyag által megkötött kromatinban. Ez a megfigyelés az NRP fehérjék foszfatáz gátló hatásával együtt azt sugallja, hogy az NRP proteinek szerepet játszhatnak a kromatin átrendeződésében és a transzkripció szabályzásában.

Élesztőben a hiszton H3 Ser10 foszforilációja csak bizonyos gének kifejeződésénél fordul elő. Ez valószínűsíthető más eukarióta élőlényeknél is. Mivel ecetmuslicánál ezt a fajta hiszton modifikációt a hősokk gének átíródásakor tapasztalták, mi is a hősokk fehérjék (HSP, heat shock protein) kifejeződésének vizsgálatára koncentráltunk. Három lúdfű hősokk gén vizsgálatát vettük bele kísérleteinkbe (AtHsp18.2 AtHsp70.1, és AtHsp100), amelyek a növényekben hősokk során kifejeződő három fő HSP családot reprezentáltak. A hősokk fehérjék elnevezése és osztályokba sorolása molekulásúlyuk alapján történik [98] [99]. A növényi hősokk fehérjéknek öt csoportját különítjük el, ezek a Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, és a kis méretű Hsp fehérjék családja. Genetikai kísérletek bizonyították, hogy a Hsp100 család tagjai szükségesek a termotolerancia megszerzéséhez [100]. A Hsp70 család tagjai chaperone-ként szintén fontos szerepet töltenek be a növénysejtek hőstressz elleni védelmében [101]. A kis méretű HSP fehérjék pedig hozzájárulnak a membrán integritás fenntartásához, és megakadályozzák a fehérjék aggregációját stressz körülmények között [102].

Hipotézisünket az NRP-hiányos *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns növényeken teszteltük. Valós idejű polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk hősokk gének kifejeződését, különbséget azonban nem találtunk a dupla mutáns és a vad típusú növények között az általunk vizsgált gének tekintetében. Ez arra utal, hogy a lúdfű NRP fehérjék nem vesznek részt a hősokk gének kifejeződésének szabályozásában.

Zhu és munkatársai microarray kísérletben vizsgálták az NRP-mutáció hatását a gének kifejeződésére. Számos olyan gén kifejeződése változott meg a mutánsban a vad típusú növényekhez képest, amelyek átíródása hő, vagy patogén fertőzés hatására is megváltozik [79]. Azt is megfigyelték továbbá, hogy az *nrp1-1 nrp2-1* mutánsokban



genotoxikus stressz folyamán korábban elcsendesített gének átíródása felszabadul a gátlás alól [79]. Mindezeket figyelembe véve nem kizárt az NRP fehérjék szerepe a stresszindukálta génexpresszió szabályzásában. Ennek megerősítése azonban további kísérleteket igényel.

### **A lúdfű NRP proteinek sejtbeli elhelyezkedése**

Az NRP fehérjék állati homológja, a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> egy multifunkciós fehérje, amely szerepet tölt be többek között a PP2A gátlásban, a transzkripció, a hiszton deacetiláció, az apoptózis, a DNS-metiláció, és a sejtosztódás szabályzásában. Ezen funkciók egy része a sejtmaghoz kötődik. Ennek megfelelően a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> sejtmagi lokalizációt mutat, továbbá kimutatták, hogy a kromatinhoz kötődik. Ismereteink a növényi NRP fehérjékről korlátozottabbak, mégis úgy tűnik, hogy ezek a fehérjék is számos funkcióval bírnak. Befolyásolják a sejtosztódást, a géncsendesítést, és a DNS károsító ágensek iránti érzékenységet.

Ezeknek a folyamatoknak a nagy része is sejtmagi lokalizációt igényel, ezzel egyetértésben mi is a sejtmagban mutattuk ki a fluoreszcens fehérjékkel megjelölt lúdfű NRP proteineket. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy standard körülmények között az At NRP1 a sejtmagban oldott állapotban van, és erősen mobilis. Ez teszi lehetővé azt, hogy a sejtek feltárása során könnyen kijut a sejtmagból. Azt is megfigyeltük, hogy magas hőmérsékleten végzett hősokk következtében az NRP fehérjék kötött formába kerülnek. Az NRP proteinek ilyenkor sejtmagi fehérjékhez, vélhetően hisztonokhoz kötődnek, amit az NRP fehérjék, és a hiszton H3 koimmunoprecipitálással kimutatott kölcsönhatása támaszt alá. Ez a kötődés stabilan fennmarad (kísérleti körülményeink között legalább 42 óráig), és alacsonyabb hőmérsékleten (37°C) történő stresszkezelés nem váltja ki.

### **Az NRP mutáció és az At NRP1 túltermelésének hatásai**

A dupla mutáns növényekben nem találtunk eltérő foszfohiszton H3 szintet, és eltérő génkifejeződést hősokk után a vad típusú növényekhez képest. Ennek azonban az is

lehet a magyarázata, hogy szobahőmérsékleten az At NRP1 szabad állapotban fordul elő a sejtmagban, és csak erős hősokek (45°C) hatására kötődik meg, feltételezhetően hiszton H3 molekulákhoz. Így elképzelhető, hogy az NRP fehérjék, az erős hősockokra adott válaszbán betöltenek a kromatinnal kapcsolatos valamilyen szerepet. Ezt azonban eddig még nem sikerült igazolnunk, mivel a dupla mutáns és vad típusú növények nem mutatnak eltérést a 45 °C-os kezelésre adott válaszbán (Domoki Mónika kísérletei alapján). Mindazonáltal az is valószínűsíthető, hogy az NRP proteinekkal rokon NAP1 fehérjék részben átveszik az NRP proteinek szerepét a mutánsokban.

Az At NRP1-et túltermelő vonal nem mutat semmilyen szemmel látható fenotípust. A dupla mutáns növényekhez hasonlóan nem tapasztaltunk bennük eltérő hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> szintet sem a kontroll növényekhez képest. Szembetűnő különbséget feltehetően azért sem várhatunk, mert az NRP fehérjék a vad típusú növényekben is nagy mennyiségben vannak jelen (immunoblot kísérleteink során minden körülmény között erős jelölődést kaptunk NRP ellenanyaggal). Így elképzelhető, hogy az amúgy is nagy mennyiségben jelenlévő At NRP1 fehérje túltermeltetése nem okoz a növényekben olyan jelentős változást, amit biokémiai eszközeinkkel kimutathatnánk. Ezért az NRP hiányos *nrp1-1 nrp2-1* mutánsok vizsgálata nagyobb lehetőségekkel kecsegtet. A jövőben tervezzük a dupla mutáns növények mélyrehatóbb vizsgálatát, különös tekintettel az NRP fehérjék hőtűrésben és a kromatinszerveződés szabályozásában betöltött szerepére.

Felvetődött bennünk az a kérdés, hogy az At NRP1 magas hőmérséklet okozta immobilizálódását mi okozza. Vajon specifikus kötődésről van szó, vagy csupán a hőstressznek valamiféle fixáló hatása folytán következik be? Állati sejtekben ismeretes ugyanis, hogy hősokek hatására a sejtmagi fehérjék aggregálódnak. Ennek a jelenségnek a szerepe nem tisztázott, habár a hőre bekövetkező fehérjeaggregáció mértéke összefüggésben van a HeLa sejtek hőtűrésével [103]. Növényekben is előfordul hőre bekövetkező fehérjeaggregáció: hosszú ideig tartó hőstressz hatására: a kis méretű hősokekfehérjék hősokek granulomokat alkotnak [104]. A hősokek granulomok olyan citoplazmás 40 nm nagyságú komplexek, amelyek egyedülállóan fordulnak elő növényekben, és fontos szerepük van a növénysejtek hőtűrésében [104]. Mi is megvizsgáltuk ezért a magas hőmérsékleten (45°C) kezelt növények hőtűrését.

Különböző módszerekkel megvizsgálva a növények túlélését azt tapasztaltuk, hogy a túltermelő növények csekély mértékben jobban túrik az erős hőkezelést a null szegregáns növényekhez képest. A dupla mutáns növények hőtűrésének vizsgálatát kutatócsoportunkban dr. Domoki Mónika végezte. 44°C-on végzett hősokkot követően a dupla mutáns növények túlélési aránya 15-30% volt, míg a vad típusú növényeké 60%. Mindezekből arra következtethetünk, hogy az NRP proteinek jelenléte hozzájárul a lúdfű növények hőtűréséhez. A mutáns és túltermelő növények eltérő hőtűró képessége arra utal, hogy az NRP fehérjék magas hőmérsékleten történő immobilizálódása nem jár azok funkciójának elvesztésével, sőt, valamilyen formában hozzájárul a sejtek megvédéséhez. A növények hőtűrése sok faktoron múlik. Ezek közé tartozik a membránszerkezet fenntartása, ozmotikumok felhalmozása, reaktív oxigén gyökök ártalmatlanítása, és hősokk fehérjék átíródása [105]. Ezek között sok olyan folyamat van, amely hiszton modifikációtól, kromatin átrendeződéstől függ. Hogy az NRP proteinek milyen folyamatot indítanak magas hőmérséklet hatására, még nem tudjuk. Izgalmas feladat lesz a jövőben feltárni a növényi NRP fehérjék szerepét ebben a sokrétű és szövevényes rendszerben, a hősokkválaszban.

---

## Összefoglaló

---

A hisztonok négy fajtája, a hiszton H2A, H2B, H3 és H4 egy oktamer (8 részből álló) egységet alkotva az alapját képezi a nukleoszómáknak. Erre tekeredik a DNS, minden egyes hiszton oktameren két csavarulatot alkotva. A sejtciklus S fázisában történő DNS replikáció során a hisztonok leválnak a kromoszómákról, hogy a leánysejtekben újraszerveződve ismét kromatinná alakuljanak a DNS molekulákkal. A hisztonok cserélődése, átszerveződése azonban nem csak mitózis alatt történik. Újonnan szintetizálódott hiszton variánsok épülnek be a kromatinba transzkripció, DNS javítás, és rekombináció során is. A hiszton chaperone-ok a hisztonokhoz kötődnek, és részt vesznek a kromatin folytonos újraszerveződésében, ezen kívül megakadályozzák az erősen pozitív töltésű hisztonok és az erősen negatív töltésű DNS spontán aggregációját.

A hiszton H2A és H2B proteinek hiszton chaperone-ja a NAP1 (nucleosome assembly protein 1), amely segíti azok kromatinná csomagolódását mitózis során. A NAP1 fehérjékről kialakuló kép azt mutatja, hogy a hiszton H2A és H2B fehérjék nukleoszómába való beépülésén túl segítik azok sejtmagba történő szállítását, és szabályozzák a kromatinszerkezet aktív átalakulásait. Mindemellett a kromatinnal kölcsönhatva, mint szövetspecifikus faktoroknak, szerepük van a sejtosztódás és a génkifejeződés szabályozásában.

A NAP1 fehérjecsalád tagjai savas karakterű fehérjék. Mindegyikük tartalmaz egy konzervált központi NAP domént. Ezen kívül hordoznak egy erősen savas C-terminális domént, és egy változó hosszúságú N-terminális kezdeti szakaszt. Élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) egyetlen NAP1 fehérje fordul elő. Ezzel szemben a többsejtű organizmusok számos NAP1, és NAP1-szerű fehérjével rendelkeznek. Növényekben a NAP1 fehérjéknek számos fajtája fordul elő, nem egy gén által kódoltak. A NAP1 fehérjék mellett a növények rendelkeznek a NAP1 fehérjével rokon az NRP (*NAP1-related protein*) fehérjékkel is. Ezek a fehérjék rokonok a humán SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> fehérjével, mely a NAP1 családon belül külön csoportot képez. A lúdfű NAP1 család négy NAP1 fehérjét (NAP1;1, NAP1;2, NAP1;3, és NAP1;4), és két NAP1 rokon NRP fehérjét (NRP1 és NRP2) tartalmaz.

Az NRP fehérjék humán homológja, a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> ismert Protein Foszfataz 2A (PP2A) gátló. Deléciós mutánsok segítségével kimutatták, hogy a PP2A-gátláshoz elengedhetetlen a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> 25-119-ig terjedő aminosav szekvenciája. Mivel ez a régió nagyfokú hasonlóságot mutat a lúdfű és lucerna növények azonos helyen lévő aminosav szekvenciájával, mi is megvizsgáltuk a növényi NRP fehérjék foszfataz gátló tulajdonságát. Kísérleteinkben a két legfontosabb szerin/treonin foszfataz, a PP1 és a PP2A aktivitását vizsgáltuk. Mindkét enzim számtalan folyamat irányítását végzi mind állati, mind növényi sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a lúdfű, és a lucerna NRP fehérjék *in vitro* fokozottan gátolják az állati PP2A aktivitását. Az Arabidopsis thaliana NRP1 (At NRP1) ezen felül gátolja az immunoprecipitált lúdfű PP2A enzimet, és *in vivo* kölcsönhat vele.

Mivel ecetmuslicában az At NRP proteinekkal nagyfokú homológiát mutató SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> szerepet játszik a hiszton H3 molekula defoszforilálásában hősokk folyamán, mi is kíváncsiak voltunk, vajon kölcsönhat-e az At NRP1 a hiszton H3 molekulával, és befolyásolja-e annak defoszforilálódását. Ezen kívül az At NRP1 hősokkban betöltött esetleges szerepét is tisztázni kívántuk.

Kísérleteinkben mind a lúdfű, mind a lucerna NRP fehérjék nagy affinitással gátolták a hisztonok defoszforilációját *in vitro*, valamint *in vivo* kölcsönhatottak a hiszton H3 molekulával. Így valószínű, hogy a velük rokon NAP1 proteinekhez hasonlóan a növényi NRP fehérjék is részt vesznek a kromatin átformálásával kapcsolatos folyamatokban.

Állatokban a hiszton H3 tizedik szerinen történő foszforilálódása (hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>) a transzkripció szabályzásával függ össze. Mivel ecetmuslicánál ezt a fajta hiszton modifikációt a hősokk gének átíródásakor tapasztalták, mi is a hősokk fehérjék (HSP, heat shock protein) kifejeződésének vizsgálatára koncentráltunk. Valós idejű polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk hősokk gének kifejeződését, különbséget azonban nem találtunk a dupla mutáns *nrp1-1 nrp2-1* és a vad típusú növények között az általunk vizsgált gének tekintetében. Kimutattuk azonban, hogy a hőindukálta génexpresszió a hiszton H3<sub>(pSer10)</sub>-et tartalmazó kromatinhoz kötődik. Ennek a fajta hisztonmodifikációnak a szerepét korábban még nem mutatták ki a hősokk közvetítette génkifejeződésben növényekben.

Az NRP fehérjék állati homológja, a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> egy multifunkciós fehérje, amely szerepet tölt be többek között a PP2A gátlásban, a transzkripció, a hiszton deacetiláció, az apoptózis, a DNS-metiláció, és a sejtosztódás szabályzásában. Ezen funkciók egy része a sejtmaghoz kötődik. Ennek megfelelően a SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> sejtmagi lokalizációt mutat, továbbá kimutatták, hogy a kromatinhoz kötődik. Ismereteink a növényi NRP fehérjékről korlátozottabbak, mégis úgy tűnik, hogy ezek a fehérjék is számos funkcióval bírnak. Befolyásolják a sejtosztódást, a géncsendesítést, és a DNS károsító ágensek iránti érzékenységet.

Ezeknek a folyamatoknak a nagy része is sejtmagi lokalizációt igényel, ezzel egyetértésben mi is a sejtmagban mutattuk ki a fluoreszcens fehérjékkel megjelölt lúdfű NRP proteineket. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy standard körülmények között az At NRP1 a sejtmagban oldott állapotban van, és erősen mobilis. Ez teszi lehetővé azt, hogy a sejtek feltárása során könnyen kijut a sejtmagból. Azt is megfigyeltük, hogy magas hőmérsékleten végzett hősokk következtében az NRP fehérjék kötött formába kerülnek. Ez a kötődés stabilan fennmarad (kísérleti körülményeink között legalább 42 óráig), és alacsonyabb hőmérsékleten (37°C) történő stressz kezelés, valamint más típusú stressz kezelések (só, nehézfém, UV, és genotoxikus stressz) nem váltják ki.

Hogy az NRP fehérjék szerepét jobban megértsük, kísérleteinkbe bevontunk *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns, és az At NRP1 fehérjét túltermelő lúdfű növényeket is. A dupla mutáns növényekben nem találtunk eltérő foszfohiszton H3 szintet, és eltérő génkifejeződést hősokk után a vad típusú növényekhez képest. Az At NRP1-et túltermelő vonal nem mutat semmilyen szemmel látható fenotípust. A dupla mutáns növényekhez hasonlóan eltérő hiszton H3<sub>(pSer10)</sub> szintet sem tapasztaltunk bennük a kontroll növényekhez képest. Különböző módszerekkel megvizsgálva a növények túlélését azonban azt tapasztaltuk, hogy a túltermelő növények csekély mértékben jobban tűrik az erős hőkezelést a null szegregáns növényekhez képest. Hogy az NRP proteinek milyen folyamatot indítanak magas hőmérséklet hatására, még nem tudjuk. Izgalmas feladat lesz a jövőben feltárni a növényi NRP fehérjék szerepét ebben a sokrétű és szövevényes rendszerben, a hősokkválaszban.

---

## Summary

---

During the S-phase of the cell cycle, histone proteins are synthesized in parallel with DNA replication. Nucleosome assembly occurs by the initial deposition of the H3-H4 tetramer, then H2A-H2B onto replicating DNA. NAP1 (nucleosome assembly protein 1) represents the primary chaperone of H2A and H2B and is highly conserved from yeast to human. In *Saccharomyces cerevisiae*, NAP1 is encoded by a single gene. In mammals and plants, NAP1 belongs to a multigene family (four genes encoding close NAP1 homologues are present in the genome of *Arabidopsis thaliana*). In addition, plants contain genes encoding more distantly NAP1-related proteins (NRPs), which form a distinct phylogenetic group more closely related to the animal SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> proteins. SET was identified first as the product of a translocated gene in acute undifferentiated leukemia. In biochemical assays, SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> proteins stimulate replication of the adenovirus genome (Nagata et al., 1995) and inhibit protein phosphatase 2A (PP2A) (Li et al., 1996). The SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> protein was also identified in protein complexes with histone acetylation and methylation enzymes (Adler et al., 1997; Shikama et al., 2000), with B-type cyclins (Kellogg et al., 1995), with the granzyme A-activated DNase NM23-H1 (Fan et al., 2003), and with transcription factors (Telese et al., 2005).

Recently, the *Arabidopsis thaliana* SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> homologues, named as NAP1-related protein 1 and 2 (NRP1, At1g74560 and NRP2, At1g18800) have been shown to have roles in cell cycle regulation and root meristem formation in addition to be characterized as potential histone chaperones. As a consequence, the *Arabidopsis nrp1-nrp2* double mutants exhibit a short-root phenotype and extreme sensitivity against genotoxic stress. Furthermore, the expression of the *Medicago sativa* NRP gene has been found to be upregulated by the auxin analogue 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and during somatic embryogenesis.

Analysis of deletion mutants revealed that the region between amino acids 25-119 of the human SET/I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup> protein is required for its PP2A inhibitor property (Saito et al. 1999). As this region exhibits 75-77% similarity between the plant and the human proteins, we tested the phosphatase inhibitor capacity of plant NRPs. Phosphatase activities were

determined with either phosphorylase a or phosphohistone substrates. The recombinant *Arabidopsis thaliana* NRP1 (At NRP1) protein was able to inhibit the activity of both PP1 (protein phosphatase 1) and PP2A (protein phosphatase 2A) enzymes (purified from rabbit skeletal muscle) on both substrates in a dose dependent manner. However, there was a considerable difference in their efficiency: the At NRP1-mediated inhibition was more efficient on the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) than on PP1. The results also indicated that the phosphatase inhibition power of NRP1 is substrate specific, the protein acts more effectively on phosphohistone substrates *in vitro*, as compared with phosphorylase a. Similar results were obtained with a purified *Medicago sativa* NRP protein indicating that this inhibitory activity of plant NRP proteins is likely a general feature.

We tested the effect of At NRP1 on immunoprecipitated *Arabidopsis thaliana* PP2A as well, using histone H3<sub>(pSer10)</sub> substrate (histone H3 phosphorylated at the tenth serine residue). When increasing concentrations (0.5-2  $\mu$ M) of purified At NRP1 were added to the phosphatase reaction, the dephosphorylation reaction was inhibited in a dose dependent manner *in vitro*. An unrelated His tagged protein (His-Ms ROP6) had no effect on the phosphatase, proving that the inhibition was not caused by the basic tag of the fusion proteins.

In order to support the assumption that NRPs can serve as PP2A inhibitors *in vivo*, pull down assays were carried out. PP2A catalytic subunit antibody co-immunoprecipitated NRP proteins from *Arabidopsis* as well as from *Medicago* cell extracts. The presence of the *Arabidopsis* NRP protein in histone H3<sub>(pSer10)</sub> antibody-precipitated chromatin was also demonstrated. These assays clearly indicate the potential interaction of NRPs with PP2A and histone H3<sub>(pSer10)</sub> *in planta*.

NRP proteins have been reported to possess histone chaperone-like properties, to influence cell division, gene silencing, and sensitivity against DNA damaging agents. Most of these functions require nuclear localization of the NRP proteins and indeed, we detected fluorescent protein-NRP fusions in the nuclei. Our results indicate, however, that under normal conditions NRPs are not chromatin-bound but soluble: they are readily released from the nuclei during their isolation and are highly mobile within the nuclei as determined by a FLIP assay (fluorescence loss in photobleaching). Interestingly



however, these proteins get strongly bound to the chromatin following short heat-treatment of cells/seedlings. Only strong heat-treatment (>42°C) of Arabidopsis cells resulted in the nuclear retention of NRPs, in contrast to the untreated, or mild-heat (37°C) treated cells. Immobilization of these proteins seemed to be persistent: nuclei of heat-treated cells still keep NRPs at 42 hours after the treatment. Other stress treatments, including salt, heavy metal, genotoxic and UV stress, did not result in the nuclear retention of NRPs.

We tested the effect of deletion and overexpression of At NRP1. Neither the mutant, nor the overexpressing plant lines showed differential levels of histone H3(pSer10), as compared with the wild type or null segregant control plants. The At NRP1 overexpressing transgenic plants did not show any apparent phenotype, however, they possess slightly elevated heat tolerance capacity.

Taken together, our data show that in plants NRPs are among the mobile, soluble nuclear proteins that can form stable complex with the chromatin in response to heat. They inhibit the serine/threonine phosphatase activity of PP1 and PP2A enzymes in a substrate-specific manner. Nevertheless, Arabidopsis NRP proteins interact with PP2A and histone H3(pSer10) based on co-immunoprecipitation experiments, suggesting a role in the regulation of histone dephosphorylation.

---

## Köszönetnyilvánítás

---

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Fehér Attilának, hogy lehetőséget adott a kutatásra, továbbá, hogy szakmailag és emberileg támogatta munkámat. Köszönettel tartozom dr. Domoki Mónikának, aki részt vett számos kísérlet elvégzésében, és aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönöm dr. Ötvös Krisztinának a segítséget és a tanácsokat. Köszönettel tartozom Nagy Rózának és Katona Gyöngyvérnek segítőkész munkájukért. Köszönöm dr. Szűcs Attilának a konstrukciók elkészítéséhez nyújtott segítségét. Külön köszönettel tartozom Dunainé Fodor Csillának baráti támogatásáért. A Funkcionális Sejtbiológia Csoport valamennyi jelenlegi és volt munkatársának köszönöm a támogatását. Köszönet jár Dr. Dombrádi Viktornak, Farkas Ilonának és Csóka Baláznak a foszfatáz aktivitás mérésekért, a CROPDesign cég munkatársainak a lúdfű transzformált magokért és konstrukciókért, Dr Szilák Lászlónak az Ms NAP cDNS-ért, valamint Wen-Hui Shennek és munkatársainak, hogy rendelkezésünkre bocsátották a mutáns lúdfű magokat. Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek a támogatást és biztatást, férjemnek és gyermekeimnek a türelmet és szeretetet.

---

## Irodalomjegyzék

---

- [1] M. Domoki, J. Györgyey, J. Bíró, T. P. Pasternak, Á. Zvara, S. Bottka, L. G. Puskás, D. Dudits, and A. Fehér, "Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, vol. 1759, no. 11–12, pp. 543–551, 2006.
- [2] N. A. Compagnone, P. Zhang, J. Vigne, and S. H. Mellon, "Novel Role for the Nuclear Phosphoprotein SET in Transcriptional Activation of P450c17 and Initiation of Neurosteroidogenesis," no. 14, pp. 875–888.
- [3] M. Okuwaki, "Template Activating Factor-I Remodels the Chromatin Structure and Stimulates Transcription from the Chromatin Template \*," vol. 273, no. 51, pp. 34511–34518, 1998.
- [4] S. Seo, P. Mcnamara, S. Heo, A. Turner, W. S. Lane, and D. Chakravarti, "Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT , a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein," vol. 104, pp. 119–130, 2001.
- [5] Z. Fan, P. J. Beresford, D. Y. Oh, D. Zhang, and J. Lieberman, "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor.," *Cell*, vol. 112, no. 5, pp. 659–72, Mar. 2003.
- [6] B. Cyclins and A. W. Murray, "Members of the NAP/SET Family of Proteins Interact Specifically with B-Type Cyclins," vol. 130, no. 3, pp. 661–673, 1995.
- [7] Z. Chai, B. Sarcevic, a Mawson, and B. H. Toh, "SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 36, pp. 33665–74, Sep. 2001.
- [8] M. Li, A. Makkinje, and Z. Damuni, "The Myeloid Leukemia-associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 19, pp. 11059–11062, May 1996.
- [9] Y.-J. Park and K. Luger, "Structure and function of nucleosome assembly proteins This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 84, no. 4, p. 549, Aug. 2006.
- [10] Y. ISHIMI, J. HIROSUMI, W. SATO, K. SUGASAWA, S. YOKOTA, F. HANAOKA, and M. YAMADA, "Purification and initial characterization of a protein which facilitates

- assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells," *European Journal of Biochemistry*, vol. 142, no. 3, pp. 431–439, 1984.
- [11] H. Asahara, S. Tartare-Deckert, T. Nakagawa, T. Ikehara, F. Hirose, T. Hunter, T. Ito, and M. Montminy, "Dual roles of p300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with nucleosome assembly protein 1 in vitro.," *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 9, pp. 2974–83, May 2002.
- [12] P. P. Walter, T. A. Owen-Hughes, J. Côté, and J. L. Workman, "Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer.," *Molecular and cellular biology*, vol. 15, no. 11, pp. 6178–87, Nov. 1995.
- [13] R. Altman and D. Kellogg, "Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase.," *The Journal of cell biology*, vol. 138, no. 1, pp. 119–30, Jul. 1997.
- [14] M. Miyaji-Yamaguchi, K. Kato, R. Nakano, T. Akashi, A. Kikuchi, and K. Nagata, "Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression.," *Molecular and cellular biology*, vol. 23, no. 18, pp. 6672–84, Sep. 2003.
- [15] T. Fujii-Nakata, Y. Ishimi, A. Okuda, and A. Kikuchi, "Functional analysis of nucleosome assembly protein, NAP-1. The negatively charged COOH-terminal region is not necessary for the intrinsic assembly activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 29, pp. 20980–6, Oct. 1992.
- [16] Y.-J. Park and K. Luger, "The structure of nucleosome assembly protein 1.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 5, pp. 1248–53, Jan. 2006.
- [17] Y. Ishimi and A. Kikuchi, "Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 266, no. 11, pp. 7025–9, Apr. 1991.
- [18] R. Krick, S. Jakubiczka, and J. Arnemann, "Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes.," *Gene*, vol. 302, no. 1–2, pp. 11–9, Jan. 2003.
- [19] F. Schnieders, T. Dörk, J. Arnemann, T. Vogel, M. Werner, and J. Schmidtke, "Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues.," *Human molecular genetics*, vol. 5, no. 11, pp. 1801–7, Nov. 1996.
- [20] C.-W. Lin, T.-N. Huang, G.-S. Wang, T.-Y. Kuo, T.-Y. Yen, and Y.-P. Hsueh, "Neural activity- and development-dependent expression and distribution of CASK interacting nucleosome assembly protein in mouse brain.," *The Journal of comparative neurology*, vol. 494, no. 4, pp. 606–19, Feb. 2006.

- [21] A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.-F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.-M. Claverie, and O. Gascuel, "Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.," *Nucleic acids research*, vol. 36, no. Web Server issue, pp. W465–9, Jul. 2008.
- [22] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251–60, Sep. 1997.
- [23] A. Groth, "Replicating chromatin: a tale of histones.," *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 87, no. 1Groth, A. (2009). Replicating chromatin: a tale of histones. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 87(1), 51–63. doi:10.1139/O08–102, pp. 51–63, Feb. 2009.
- [24] J. Jin, Y. Cai, B. Li, R. C. Conaway, J. L. Workman, J. W. Conaway, and T. Kusch, "In and out: histone variant exchange in chromatin.," *Trends in biochemical sciences*, vol. 30, no. 12, pp. 680–7, Dec. 2005.
- [25] R. J. Burgess and Z. Zhang, "Histones, histone chaperones and nucleosome assembly.," *Protein & cell*, vol. 1, no. 7, pp. 607–12, Jul. 2010.
- [26] Y. ISHIMI, M. KOJIMA, M. YAMADA, and F. HANAOKA, "Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones.," *European Journal of Biochemistry*, vol. 162, no. 1, pp. 19–24, 1987.
- [27] T. Krude and C. Keller, "Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle.," *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, vol. 58, no. 5–6, pp. 665–72, May 2001.
- [28] K. Luger, "Dynamic nucleosomes.," *Chromosome research*: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology, vol. 14, no. 1, pp. 5–16, Jan. 2006.
- [29] M. Attia, A. Förster, C. Rachez, P. Freemont, P. Avner, and U. C. Rogner, "Interaction between nucleosome assembly protein 1-like family members.," *Journal of molecular biology*, vol. 407, no. 5, pp. 647–60, Apr. 2011.
- [30] M. Okuwaki, K. Kato, and K. Nagata, "Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones.," *Genes to cells*: devoted to molecular & cellular mechanisms, vol. 15, no. 1, pp. 13–27, Jan. 2010.
- [31] U. C. Rogner, D. D. Spyropoulos, N. Le Novère, J. P. Changeux, and P. Avner, "Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2.," *Nature genetics*, vol. 25, no. 4, pp. 431–5, Aug. 2000.
- [32] F. S. Fan, H. H. Shen, W. P. Tseng, P. M. Chen, and S. F. Tsai, "Molecular cloning and characterization of a human brain-specific gene implicated in neuronal

- differentiation.," *Brain research. Molecular brain research*, vol. 54, no. 1, pp. 113–23, Feb. 1998.
- [33] P. Rodriguez, D. Munroe, D. Prawitt, L. L. Chu, E. Bric, J. Kim, L. H. Reid, C. Davies, H. Nakagama, R. Loebbert, A. Winterpacht, M. J. Petruzzi, M. J. Higgins, N. Nowak, G. Evans, T. Shows, B. E. Weissman, B. Zabel, D. E. Housman, and J. Pelletier, "Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone.," *Genomics*, vol. 44, no. 3, pp. 253–65, Sep. 1997.
- [34] P. Rodriguez, J. Pelletier, G. B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos, "NAP-2: histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle.," *Journal of molecular biology*, vol. 298, no. 2, pp. 225–38, Apr. 2000.
- [35] K. Ohkuni, K. Shirahige, and A. Kikuchi, "Genome-wide expression analysis of NAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 306, no. 1, pp. 5–9, Jun. 2003.
- [36] D. R. Kellogg and A. W. Murray, "NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast.," *The Journal of cell biology*, vol. 130, no. 3, pp. 675–85, Aug. 1995.
- [37] D. R. Kellogg, A. Kikuchi, T. Fujii-Nakata, C. W. Turck, and A. W. Murray, "Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B- type cyclins," *The Journal of Cell Biology*, vol. 130, no. 3, pp. 661–673, Aug. 1995.
- [38] S. Lankenau, T. Barnickel, J. Marhold, F. Lyko, B. M. Mechler, and D.-H. Lankenau, "Knockout targeting of the *Drosophila nap1* gene and examination of DNA repair tracts in the recombination products.," *Genetics*, vol. 163, no. 2, pp. 611–23, Feb. 2003.
- [39] T. Ito, M. Bulger, R. Kobayashi, and J. T. Kadonaga, "Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays.," *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 6, pp. 3112–24, Jun. 1996.
- [40] N. Mosammaparast, C. S. Ewart, and L. F. Pemberton, "A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B.," *The EMBO journal*, vol. 21, no. 23, pp. 6527–38, Dec. 2002.
- [41] J. Zlatanova, C. Seebart, and M. Tomschik, "Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills.," *FASEB journal*: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, vol. 21, no. 7, pp. 1294–310, May 2007.
- [42] A. Dong, Y. Zhu, Y. Yu, K. Cao, C. Sun, and W.-H. Shen, "Regulation of biosynthesis and intracellular localization of rice and tobacco homologues of nucleosome assembly protein 1.," *Planta*, vol. 216, no. 4, pp. 561–70, Feb. 2003.

- [43] A. Dong, Z. Liu, Y. Zhu, F. Yu, Z. Li, K. Cao, and W.-H. Shen, "Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants," *Plant physiology*, vol. 138, no. 3, pp. 1446–56, Jul. 2005.
- [44] H. Yoon, M. Kim, S. Lee, I. Hwang, J. Dong Bahk, J. Hong, Y. Ishimi, and M. Cho, "Molecular cloning and functional characterization of a cDNA encoding nucleosome assembly protein 1 (NAP-1) from soybean," *Molecular and General Genetics MGG*, vol. 249, no. 5, pp. 465–473 LA – English, 1995.
- [45] Z. Liu, Y. Zhu, J. Gao, F. Yu, A. Dong, and W.-H. Shen, "Molecular and reverse genetic characterization of NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1 (NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in Arabidopsis thaliana," *The Plant journal: for cell and molecular biology*, vol. 59, no. 1, pp. 27–38, Jul. 2009.
- [46] A. Galichet and W. Gruissem, "Developmentally controlled farnesylation modulates AtNAP1;1 function in cell proliferation and cell expansion during Arabidopsis leaf development," *Plant physiology*, vol. 142, no. 4, pp. 1412–26, Dec. 2006.
- [47] Z.-Q. Liu, J. Gao, A.-W. Dong, and W.-H. Shen, "A truncated Arabidopsis NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the Atnap1;3-2 mutant," *Molecular plant*, vol. 2, no. 4, pp. 688–99, Jul. 2009.
- [48] K. Nagata, S. Saito, M. Okuwaki, H. Kawase, A. Furuya, A. Kusano, N. Hanai, A. Okuda, and A. Kikuchi, "Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types," *Experimental cell research*, vol. 240, no. 2, pp. 274–81, May 1998.
- [49] K. Matsumoto, K. Nagata, M. Okuwaki, and M. Tsujimoto, "Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I," *FEBS Letters*, vol. 463, no. 3, pp. 285–288, 17-Dec-1999.
- [50] S. Saito, M. Miyaji-yamaguchi, T. Shimoyama, and K. Nagata, "Functional Domains of Template-Activating Factor-I as a Protein Phosphatase 2A Inhibitor," vol. 475, pp. 471–475, 1999.
- [51] Y. Adachi, G. N. Pavlakis, and T. D. Copeland, "Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 3, pp. 2258–2262, Jan. 1994.
- [52] Y. Anazawa, H. Nakagawa, M. Furihara, S. Ashida, K. Tamura, H. Yoshioka, T. Shuin, T. Fujioka, T. Katagiri, and Y. Nakamura, "PCOTH, a novel gene overexpressed in prostate cancers, promotes prostate cancer cell growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-Ibeta/SET," *Cancer research*, vol. 65, no. 11, pp. 4578–86, Jun. 2005.

- [53] M. V. O. N. Lindern, S. Van Baal, J. Wiegant, A. Raap, A. Hagemeyer, and G. Grosveld, "Putative Oncogene Associated with Myeloid," vol. 12, no. 8, pp. 3346–3355, 1992.
- [54] M. Fornerod, J. Boer, S. van Baal, M. Jaeglé, M. von Lindern, K. G. Murti, D. Davis, J. Bonten, A. Buijs, and G. Grosveld, "Relocation of the carboxyterminal part of CAN from the nuclear envelope to the nucleus as a result of leukemia-specific chromosome rearrangements.," *Oncogene*, vol. 10, no. 9, pp. 1739–48, May 1995.
- [55] U. Ozbek, A. Kandilci, S. van Baal, J. Bonten, K. Boyd, P. Franken, R. Fodde, and G. C. Grosveld, "SET-CAN, the product of the t(9;9) in acute undifferentiated leukemia, causes expansion of early hematopoietic progenitors and hyperproliferation of stomach mucosa in transgenic mice.," *The American journal of pathology*, vol. 171, no. 2, pp. 654–66, Aug. 2007.
- [56] M. Li and Z. Damuni, "I1PP2A and I2PP2A. Two potent protein phosphatase 2A-specific inhibitor proteins.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 93, pp. 59–66, Jan. 1998.
- [57] K. Matsumoto, K. Nagata, M. Ui, and F. Hanaoka, "Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 14, pp. 10582–10587, May 1993.
- [58] H. Haruki, M. Okuwaki, M. Miyagishi, K. Taira, and K. Nagata, "Involvement of template-activating factor I/SET in transcription of adenovirus early genes as a positive-acting factor.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 2, pp. 794–801, Jan. 2006.
- [59] M. J. Gamble, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L. P. Freedman, and R. P. Fisher, "The Histone Chaperone TAF-I/SET/INHAT Is Required for Transcription In Vitro of Chromatin Templates," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 2, pp. 797–807, Jan. 2005.
- [60] M. Okuwaki and K. Nagata, "Template Activating Factor-I Remodels the Chromatin Structure and Stimulates Transcription from the Chromatin Template," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 51, pp. 34511–34518, Dec. 1998.
- [61] N. Cervoni, N. Detich, S.-B. Seo, D. Chakravarti, and M. Szyf, "The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 28, pp. 25026–31, Jul. 2002.
- [62] Z. Karetsov, A. Emmanouilidou, I. Sanidas, S. Liokatis, E. Nikolakaki, A. S. Politou, and T. Papamarcaki, "Identification of distinct SET/TAF-1beta domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction.," *BMC biochemistry*, vol. 10, p. 10, Jan. 2009.



- [63] S. Muto, M. Senda, Y. Akai, L. Sato, T. Suzuki, R. Nagai, T. Senda, and M. Horikoshi, "Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 11, pp. 4285–90, Mar. 2007.
- [64] T. Suzuki, S. Muto, S. Miyamoto, K. Aizawa, M. Horikoshi, and R. Nagai, "Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 31, pp. 28758–64, Aug. 2003.
- [65] M. a. Loven, "A Novel Estrogen Receptor alpha-Associated Protein, Template-Activating Factor Ibeta, Inhibits Acetylation and Transactivation," *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 1, pp. 67–78, Oct. 2002.
- [66] K. E. N. Matsumoto, K. Nagata, and M. Miyaji-yamaguchi, "Sperm Chromatin Decondensation by Template Activating Factor I through Direct Interaction with Basic Proteins," vol. 19, no. 10, pp. 6940–6952, 1999.
- [67] Z. Fan, P. J. Beresford, D. Zhang, and J. Lieberman, "HMG2 Interacts with the Nucleosome Assembly Protein SET and Is a Target of the Cytotoxic T-Lymphocyte Protease Granzyme A," vol. 22, no. 8, pp. 2810–2820, 2002.
- [68] D. Zhang, M. S. Pasternack, P. J. Beresford, L. Wagner, a H. Greenberg, and J. Lieberman, "Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 5, pp. 3683–90, Feb. 2001.
- [69] S. Miyamoto, T. Suzuki, S. Muto, K. Aizawa, A. Kimura, Y. Mizuno, T. Nagino, Y. Imai, N. Adachi, M. Horikoshi, and R. Nagai, "Positive and Negative Regulation of the Cardiovascular Transcription Factor KLF5 by p300 and the Oncogenic Regulator SET through Interaction and Acetylation on the DNA-Binding Domain," vol. 23, no. 23, pp. 8528–8541, 2003.
- [70] A. V Pandey, S. H. Mellon, and W. L. Miller, "Protein phosphatase 2A and phosphoprotein SET regulate androgen production by P450c17.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 5, pp. 2837–44, Jan. 2003.
- [71] H. van Leeuwen, "Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT," *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 9, pp. 2501–2510, Sep. 2003.
- [72] S. G. Carlson, E. Eng, E. G. Kim, E. J. Perlman, T. D. Copeland, and B. J. Ballermann, "Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor.," *Journal of the American Society of Nephrology*: JASN, vol. 9, no. 10, pp. 1873–80, Oct. 1998.

- [73] D. J. Christensen, Y. Chen, J. Oddo, K. M. Matta, J. Neil, E. D. Davis, A. D. Volkheimer, M. C. Lanasa, D. R. Friedman, B. K. Goodman, J. P. Gockerman, L. F. Diehl, C. M. de Castro, J. O. Moore, M. P. Vitek, and J. B. Weinberg, "SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target.," *Blood*, vol. 118, no. 15, pp. 4150–8, Oct. 2011.
- [74] V. Ouellet, C. Le Page, M.-C. Guyot, C. Lussier, P. N. Tonin, D. M. Provencher, and A.-M. Mes-Masson, "SET complex in serous epithelial ovarian cancer.," *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, vol. 119, no. 9, pp. 2119–26, Nov. 2006.
- [75] H. Quentmeier, B. Schneider, S. Röhrs, J. Romani, M. Zaborski, R. a F. Macleod, and H. G. Drexler, "SET-NUP214 fusion in acute myeloid leukemia- and T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cell lines.," *Journal of hematology & oncology*, vol. 2, p. 3, Jan. 2009.
- [76] N. Canela, A. Rodriguez-Vilarrupla, J. M. Estanyol, C. Diaz, M. J. Pujol, N. Agell, and O. Bachs, "The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 2, pp. 1158–64, Jan. 2003.
- [77] J. M. Estanyol, M. Jaumot, O. Casanovas, A. Rodriguez-Vilarrupla, N. Agell, and O. Bachs, "The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 46, pp. 33161–5, Nov. 1999.
- [78] S. J. Nowak, C.-Y. Pai, and V. G. Corces, "Protein Phosphatase 2A Activity Affects Histone H3 Phosphorylation and Transcription in *Drosophila melanogaster*," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 17, pp. 6129–6138, Sep. 2003.
- [79] Y. Zhu, A. Dong, D. Meyer, O. Pichon, J.-P. Renou, K. Cao, and W.-H. Shen, "Arabidopsis NRP1 and NRP2 encode histone chaperones and are required for maintaining postembryonic root growth.," *The Plant cell*, vol. 18, no. 11, pp. 2879–92, Nov. 2006.
- [80] J. Gao, Y. Zhu, W. Zhou, J. Molinier, A. Dong, and W.-H. Shen, "NAP1 family histone chaperones are required for somatic homologous recombination in Arabidopsis.," *The Plant cell*, vol. 24, no. 4, pp. 1437–47, Apr. 2012.
- [81] D. Schuermann, J. Molinier, O. Fritsch, and B. Hohn, "The dual nature of homologous recombination in plants.," *Trends in genetics*: *TIG*, vol. 21, no. 3, pp. 172–81, Mar. 2005.
- [82] F. Erdödi, B. Tóth, K. Hirano, M. Hirano, D. J. Hartshorne, and P. Gergely, "Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo.," *The American journal of physiology*, vol. 269, no. 5 Pt 1, pp. C1176–84, Nov. 1995.

- [83] S. R. Silberman, M. Speth, R. Nemani, M. K. Ganapathi, V. Dombradi, H. Paris, and E. Y. Lee, "Isolation and characterization of rabbit skeletal muscle protein phosphatases C-I and C-II," *The Journal of biological chemistry*, vol. 259, no. 5, pp. 2913–22, Mar. 1984.
- [84] M. Karimi, D. Inzé, and A. Depicker, "GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.," *Trends in plant science*, vol. 7, no. 5, pp. 193–5, May 2002.
- [85] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods San Diego Calif*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [86] S. Luan, "Protein phosphatases in plants.," *Annual review of plant biology*, vol. 54, pp. 63–92, Jan. 2003.
- [87] P. T. W. Cohen, "Protein phosphatase 1 - targeted in many directions," *Journal of Cell Science*, vol. 115, no. 2, pp. 241–256, Jan. 2002.
- [88] V. Janssens and J. Goris, "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling," *The Biochemical journal*, vol. 353, no. Pt 3, pp. 417–39, Feb. 2001.
- [89] G. B. G. Moorhead, L. Trinkle-Mulcahy, and A. Ulke-Lemée, "Emerging roles of nuclear protein phosphatases.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 8, no. 3, pp. 234–44, Mar. 2007.
- [90] D. Dorjgotov, M. E. Jurca, C. Fodor-Dunai, A. Szucs, K. Otvös, E. Klement, J. Bíró, and A. Fehér, "Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro.," *FEBS letters*, vol. 583, no. 7, pp. 1175–82, Apr. 2009.
- [91] Y. Katayose, M. Li, S. W. Al-Murrani, S. Shenolikar, and Z. Damuni, "Protein phosphatase 2A inhibitors, I(1)(PP2A) and I(2)(PP2A), associate with and modify the substrate specificity of protein phosphatase 1.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 13, pp. 9209–14, Mar. 2000.
- [92] T. Jenuwein and C. D. Allis, "Translating the Histone Code," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1074–1080, Aug. 2001.
- [93] C. Prigent and S. Dimitrov, "Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?," *Journal of cell science*, vol. 116, no. Pt 18, pp. 3677–85, Oct. 2003.
- [94] A. Houben, D. Demidov, A. D. Caperta, R. Karimi, F. Agueci, and L. Vlasenko, "Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, vol. 1769, no. 5–6, pp. 308–315, May 2007.

- [95] K. M. Johansen and J. Johansen, "Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation.," *Chromosome research*: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology, vol. 14, no. 4, pp. 393–404, Jan. 2006.
- [96] S. J. Nowak and V. G. Corces, "Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci," *Genes and Development*, vol. 14, no. 23, pp. 3003–3013, Dec. 2000.
- [97] A. Sokol, A. Kwiatkowska, A. Jerzmanowski, and M. Prymakowska-Bosak, "Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications.," *Planta*, vol. 227, no. 1, pp. 245–54, Dec. 2007.
- [98] B. Huang and C. Xu, "Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress.," *Journal of integrative plant biology*, vol. 50, no. 10, pp. 1230–7, Oct. 2008.
- [99] M. H. Al-Whaibi, "Plant heat-shock proteins: A mini review," *Journal of King Saud University - Science*, vol. 23, no. 2, pp. 139–150, Apr. 2011.
- [100] S.-W. Hong, U. Lee, and E. Vierling, "Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures.," *Plant physiology*, vol. 132, no. 2, pp. 757–67, Jun. 2003.
- [101] G. J. Lee and E. Vierling, "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein.," *Plant physiology*, vol. 122, no. 1, pp. 189–98, Jan. 2000.
- [102] H. Nakamoto and L. Víg, "The small heat shock proteins and their clients.," *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, vol. 64, no. 3, pp. 294–306, Feb. 2007.
- [103] J. L. Roti Roti and N. Turkel, "Heat-induced changes in nuclear-associated proteins in normal and thermotolerant HeLa cells.," *Radiation research*, vol. 139, no. 1, pp. 73–81, Jul. 1994.
- [104] M. Kirschner, S. Winkelhaus, È. M. Thierfelder, and L. Nover, "Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts," vol. 24, 2000.
- [105] H.-B. Shao, Q.-J. Guo, L.-Y. Chu, X.-N. Zhao, Z.-L. Su, Y.-C. Hu, and J.-F. Cheng, "Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 54, no. 1, pp. 37–45, Jan. 2007.